

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-93

(43)公開日 平成10年(1998)1月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	ZNA	9282-4B	C 12 N 15/00	Z NAA
A 61 K 38/00	ADU		A 61 K 48/00	
48/00			C 07 H 21/04	B
C 07 H 21/04			C 07 K 14/47	
C 07 K 14/47			16/40	

審査請求 未請求 請求項の数30 FD (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-241063

(22)出願日 平成8年(1996)8月23日

(31)優先権主張番号 特願平8-122320

(32)優先日 平8(1996)4月19日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000173588

財団法人癌研究会

東京都豊島区上池袋1丁目37番1号

(72)発明者 宮園浩平

埼玉県朝霞市東弁財2-9-1

(72)発明者 一條秀憲

東京都品川区北品川5-8-15-1214

(74)代理人 弁理士 佐藤一雄 (外3名)

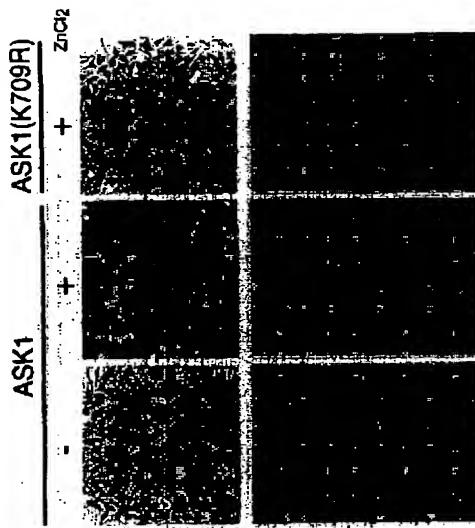
(54)【発明の名称】アポトーシス誘導タンパク質およびそれをコードする遺伝子

(57)【要約】

【課題】アポトーシスを誘導するタンパク質、それをコードする塩基配列、および悪性腫瘍治療剤の提供。

【解決手段】プロテインキナーゼ触媒領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性を亢進するタンパク質(ASK1)またはその誘導体。図はASK1の発現によるアポトーシスの誘導を示す。

図面代用写真



【特許請求の範囲】

【請求項1】プロテインキナーゼ触媒領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性を亢進する、タンパク質またはその誘導体。

【請求項2】アポトーシスを誘導する、請求項1に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項3】前記アポトーシスが、SAPKもしくはJNKおよび/またはp38の活性の亢進によって媒介される、請求項2に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項4】腫瘍死因子(TNF)によって前記SEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性亢進活性が亢進する、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項5】プロテインキナーゼ触媒領域が、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ触媒領域である、請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項6】ヒト由来である、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項7】配列番号1に記載のアミノ酸配列からなる、請求項1～6のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項8】配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および/または挿入され、および/または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および/または欠失された、請求項7に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項9】配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質またはその誘導体。

【請求項10】配列番号1のアミノ酸配列からなり、プロテインキナーゼ活性を損なうように配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および/または挿入され、および/または配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および/または欠失された、タンパク質またはその誘導体。

【請求項11】置換: K709Rを有する、請求項10に記載のタンパク質またはその誘導体。

【請求項12】請求項1～9に記載のタンパク質またはその誘導体をコードする塩基配列。

【請求項13】配列番号2のDNA配列の一部または全部を有する、請求項12に記載の塩基配列。

【請求項14】請求項10または11に記載のタンパク質またはその誘導体をコードする塩基配列。

【請求項15】請求項12または13に記載の塩基配列を含んでなる、ベクター。

【請求項16】請求項14に記載の塩基配列を含んでなる、ベクター。

【請求項17】プラスミドベクター、ウイルスベクター、およびリボソームベクターからなる群から選択される、請求項15または16に記載のベクター。

【請求項18】請求項15～17のいずれか一項に記載のベクターによって形質転換された、宿主細胞(ただし、ヒト細胞にあってはヒトから単離された細胞に限る)。

【請求項19】大腸菌、酵母、昆虫細胞、COS細胞、ミンク肺上皮細胞、リンパ細胞、纖維芽細胞、NIH/3T3細胞、CHO細胞、血液系細胞、および腫瘍細胞からなる群から選択されるものである、請求項18に記載の宿主細胞。

【請求項20】請求項18または19に記載の宿主細胞を培養し、そしてその培養物から請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質またはそれらの誘導体を単離することを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体の製造法。

【請求項21】請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体を含んでなる、悪性腫瘍治療剤。

【請求項22】請求項12または13に記載の塩基配列を含んでなる悪性腫瘍遺伝子治療剤。

【請求項23】悪性腫瘍治療剤の製造のための、請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体の使用。

【請求項24】悪性腫瘍遺伝子治療剤の製造のための、請求項12または13に記載の塩基配列の使用。

【請求項25】配列番号1の654～669番のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項26】配列番号1の654～669番のアミノ酸配列を含んでなるペプチド。

【請求項27】請求項25または26に記載のペプチドと特異的に反応する、抗体。

【請求項28】ポリクローナル抗体である、請求項27に記載の抗体。

【請求項29】請求項27または28に記載の抗体と特異的に反応する、タンパク質またはその誘導体。

【請求項30】請求項27または28に記載の抗体と特異的に反応する、請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質またはその誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、アポトーシス(細胞死)を誘導するタンパク質およびこれをコードする遺伝子に関する。

【0002】背景技術

Mitogen-activated protein (MAP)キナーゼによるシグナル伝達カスケードは、酵母から脊椎動物に至るまでよく保存された細胞内シグナル伝達経路であり、MAPキナーゼ(MAPK)、MAPKキナーゼ(MAPKK)およびMAPKKキナーゼ(MAPKKK)を含むタンパク質キナーゼの3つの異なるメンバーより構成さ

れる (T. Sturgill & J. Wu, *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 350 (1991); E. Nishida & Y. Gotoh, *Trends Biochem. Sci.*, 18, 128 (1993); B. Errede & D. Levin, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 254 (1993); C. Marshall, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4, 82 (1994))。MAPKKはMAPKKをリン酸化しこれによりMAPKKが活性化し、活性化型MAPKKはMAPKをリン酸化しこれによりMAPKが活性化する。活性化されたMAPKは細胞核へ移動し、転写因子の活性を調節し、それによって種々の遺伝子発現が制御される (T. Sturgill & J. Wu, *Biochim. Biophys. Acta.* 1092, 350 (1991); E. Nishida & Y. Gotoh, *Trends Biochem. Sci.*, 18, 128 (1993); B. Errede & D. Levin, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5, 254 (1993); C. Marshall, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4, 82 (1994))。

【0003】MAPKシグナル伝達経路に関する知見の最近の進歩によって、哺乳動物の細胞では少なくとも明らかに異なる2種類のMAPKKK-MAPKK-MAPKシグナル伝達経路が機能していることが明らかになった (R. Davis, *Trends Biochem. Sci.*, 19, 470 (1994); A. Waskiewicz & J. Cooper, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 798 (1995); J. Kyriakis & J. Avruch, *J. Biol. Chem.*, 265, 17355 (1990); B. Derijard et al., *Cell*, 76, 1025 (1994); M. Yan et al., *Nature*, 372, 798 (1994); K. Yamaguchi et al., *Science* 270, 2008 (1995); J. Kyriakis et al., *Nature*, 369, 156 (1994); I. Sanchez et al., *Nature*, 372, 794 (1994); B. Derijard et al., *Science*, 267, 682 (1995); S. Matsuda et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 12781 (1995))。これらの2種類の経路はそれぞれ、Raf-MAPKK-MAPK経路およびMEKK-SEK1(またはMKK4)-SAPK(またはJNK)経路より成る。

【0004】MKK3/MAPKK6(またはMKK6; MKK3に極めて近縁のタンパク質)およびp38タンパク質キナーゼは、それぞれMAPKKおよびMAPKの段階に相当するタンパク質キナーゼであり、これは別のMAPKシグナル伝達経路を形成していることが知られている (R. Davis, *Trends Biochem. Sci.*, 19, 470 (1994); A. Waskiewicz & J. Cooper, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 798 (1995); J. Han et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 2886 (1996); J. Raingeaud et al., *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1247 (1996); T. Moriguchi et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 13675 (1996))。

【0005】最近の研究より、SAPKおよび/またはp38 MAPキナーゼのシグナル伝達カスケードが、アポトーシスを誘導するシグナル伝達経路の少なくとも一部に関係していることが示唆されている (Z. Xia et al., *Science*, 270, 1326 (1995); Y.-R. Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 631 (1996); N. Johnson et al., *J. Biol. Chem.*, 271, 3229 (1996); M. Verheij et al., *Nature* 380, 75 (1996))。ここで、アポトーシスは、壞死とは異なる細胞死、すなわち、プログラム細胞死、を意味する。アポトーシスでは、ヌクレオソームごとにDNAが断片化され電気泳動で断片化したDNAが梯子状に観察できる。また、アポトーシスは、ガンの退縮のみならず、自己免疫疾患、HIV感染、神経疾患、肝炎、白血病、腎疾患、皮膚疾患、眼疾患および老化等にも関与していると考えられている(三浦正幸、刀祢重信、木崎治俊編集「アポトーシス研究の最前线」、実験医学V o 1. 13 (1995))。

【0006】一方、腫瘍壞死因子(TNF)- α は、強力な細胞性アポトーシス開始物質として知られている。最近、これらの細胞性アポトーシス開始物質によってSAPKシグナル伝達系が活性化されることが示された (J. Kyriakis et al., *Nature* 372, 794 (1994); J. Raingeaud et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 7420 (1995))。

【0007】しかしながら、MKK3-p38経路およびSEK1-SAPK経路の上流のMAPKKKに相当するタンパク質や、該経路の活性化のメカニズム、更には、これらの経路を介したアポトーシスの機構については、本発明者らが知る限り報告されていない。

【0008】

【発明の概要】今般、本発明者らは、SEK1-SAPKシグナル伝達経路ばかりでなくMKK3-p38シグナル伝達経路をも活性化する、MAPKKKに相当する哺乳類の新規タンパク質(ASK1)を同定した。また、前炎症性サイトカインがASK1を活性化し、活性化されたASK1がSEK1-SAPKおよびMKK3-p38シグナル伝達カスケードを介して細胞のアポトーシス誘導に関与することを見出した。また、本発明者らは、ASK1のドミナントネガティブ変異体がTNF- α が誘導するアポトーシスを阻害することを見出した。本発明はかかる知見に基づくものである。

【0009】従って、本発明は、アポトーシス誘導タンパク質およびそれをコードする塩基配列の提供をその目的とする。また、本発明は、悪性腫瘍治療剤または悪性腫瘍遺伝子治療剤の提供をその目的とする。更に、本発明は、アポトーシス誘導タンパク質の部分ペプチドおよびアポトーシス誘導タンパク質と特異的に反応する抗体の提供をその目的とする。

【0010】そして、本発明によるアポトーシス誘導タンパク質は、プロテインキナーゼ触媒領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性を亢進するタンパク質またはその誘導体、である。

【0011】

【発明の具体的説明】

定義

本発明において、「アミノ酸」とは、光学異性体、すな

わちL体およびD体、のいずれをも含む意味で用いられるものとする。従って、本発明において「タンパク質」とは、L体のアミノ酸のみによって構成されているタンパク質だけでなく、D体のアミノ酸を一部または全部含むタンパク質をも意味するものとする。

【0012】また、本発明において、「アミノ酸」とは、天然のタンパク質を構成する20種の α -アミノ酸のみならず、それら以外の α -アミノ酸、並びに β -、 γ -、 δ -アミノ酸および非天然のアミノ酸等を含む意味で用いられるものとする。従って、下記のようにタンパク質において置換されるかまたはタンパク質中に挿入されるアミノ酸としては、天然のタンパク質を構成する20種の α -アミノ酸だけに限定されることはなく、それら以外の α -アミノ酸並びに β -、 γ -、 δ -アミノ酸および非天然のアミノ酸等であってもよい。このような β -、 γ -または δ -アミノ酸としては、 β -アラニン、 γ -アミノ酪酸あるいはオルニチンが挙げられ、また天然タンパク質を構成するもの以外のアミノ酸あるいは非天然のアミノ酸としては、3、4-ジヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、1、2、3、4-テトラハイドロイソキノリン-3-カルボン酸あるいは二ペコチン酸等が挙げられる。

【0013】タンパク質変異体の変異部位は、置換される前のアミノ酸残基(一文字表記)、置換されるアミノ酸の位置、および置換された後のアミノ酸残基(一文字表記)を連続して記載することで表した。例えば、「K 709R」は、709番目のアミノ酸残基であるK(Lys:リジン)がR(Arg:アルギニン)で置換されたアミノ酸配列を表す。

【0014】本明細書において「タンパク質」とは、ペプチドを含む意味で用いられるものとする。また、本明細書において「本発明によるタンパク質」というときは、その誘導体を含む意味で用いられるものとする。

【0015】アポトーシス誘導タンパク質

本発明によるアポトーシス誘導タンパク質は、プロテインキナーゼ触媒領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性を亢進するタンパク質またはその誘導体である。アポトーシス誘導タンパク質の起源は特に限定されず、ヒトを含むホ乳類由来のものであっても、それ以外を由来とするものであってもよい。

【0016】アポトーシス誘導タンパク質は、プロテインキナーゼ触媒領域を有する。本発明において、「プロテインキナーゼ触媒領域を有する」とは、実施例1と同様の条件において解説した場合に、セリン/スレオニン・プロテインキナーゼ触媒領域の存在が認められることをいう。アポトーシス誘導タンパク質は、SEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性を亢進する。本発明において、「SEK1キナーゼ活性および/

またはMKK3キナーゼ活性を亢進する」タンパク質とは、実施例3、4および6と同様の条件において実験した場合に、SEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性の亢進が認められたと評価されるタンパク質を意味するものとする。

【0017】本発明によるタンパク質は、アポトーシスを誘導するとの性質を有する。前記アポトーシスは、SAPKもしくはJNKおよび/またはp38の活性の亢進によって媒介されるものである。前記SEK1キナーゼ活性および/またはMKK3キナーゼ活性亢進活性は、腫瘍壞死因子(TNF)によって亢進する。ここで、腫瘍壞死因子としては、例えばTNF α が挙げられる。

【0018】本明細書において、「タンパク質の誘導体」とは、タンパク質のアミノ末端(N末端)のアミノ基または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部もしくは全部、および/またはタンパク質のカルボキシル末端(C末端)のカルボキシル基または各アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部もしくは全部、および/または、タンパク質の各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基(例えば、水素基、チオール基、アミド基等)の一部もしくは全部が、適当な他の置換基によって修飾を受けたものをいう。適当な他の置換基による修飾は、例えば、タンパク質中に存在する官能基の保護、安全性ならびに組織移行性の向上、あるいは活性の増強等を目的として行われる。

【0019】タンパク質の誘導体としては、具体的には、(1)タンパク質のアミノ末端(N末端)のアミノ基または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部もしくは全部の水素原子が、置換または非置換のアルキル基(直鎖、分岐鎖または環状であってもよい)(例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、イソブチル基、ブチル基、t-ブチル基、シクロプロピル基、シクロヘキシル基、ベンジル基)、置換または非置換のアシル基(例えば、ホルミル基、アセチル基、カブロイル基、シクロヘキシカルボニル基、ベンゾイル基、フタロイル基、トシリル基、ニコチノイル基、ビペリジンカルボニル基)、ウレタン型保護基(例えば、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基、p-ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基)またはウレア型置換基(例えば、メチルアミノカルボニル基、フェニルカルボニル基、シクロヘキシルアミノカルボニル基)等によって置換されたもの、並びに(2)タンパク質のカルボキシル末端(C末端)のカルボキシル基または各アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部もしくは全部が、エステル型の修飾を受けているもの(例えば、その水素原子がメチル、エチル、イソプロピル、シクロヘキシル、フェニル、ベンジル、t-ブチル、4-ビコリルにより置換されたもの)、アミド型の修飾を受けてい

るもの（例えば、非置換アミド、C1-C6アルキルアミド（例えば、メチルアミド、エチルアミド、イソプロピルアミド）を形成しているもの、並びに（3）タンパク質の各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基（例えば、水素基、チオール基、アミノ基等）の一部もしくは全部が、上述のアミノ基と同様の置換基あるいはトリチル基などで修飾されたもの等が挙げられる。

【0020】本発明によるタンパク質の例としては、配列番号1のアミノ酸配列からなり、前記配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または前記配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質であって、プロテインキナーゼ活性を有し、かつSEK1キナーゼ活性および／またはMKK3キナーゼ活性を亢進するものが挙げられる。すなわち、ここにいう付加(addition)、挿入(insertion)、置換(substitution)、および欠失(deletion)とは、配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質のプロテインキナーゼ活性並びにSEK1キナーゼ活性および／またはMKK3キナーゼ活性を亢進する性質を損なわない(not damage)ようなものをいう。

【0021】本発明によるタンパク質は、SEK1キナーゼ活性および／またはMKK3キナーゼ活性を亢進する、との性質を有する。また、SEK1およびMKK3はアポトーシスに関与していることが知られている。従って、本発明によるタンパク質は、アポトーシスの機構解明に有用である。

【0022】本発明によれば、配列番号1のアミノ酸配列からなり、プロテインキナーゼ活性を損なうように配列番号1のアミノ酸配列に1以上のアミノ酸配列が付加および／または挿入され、および／または配列番号1のアミノ酸配列の1以上のアミノ酸が置換および／または欠失されたタンパク質またはその誘導体（ドミナントネガティブ変異体）が提供される。

【0023】このタンパク質は、プロテインキナーゼ触媒活性領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および／またはMKK3キナーゼ活性を亢進するタンパク質をプロテインキナーゼ活性を損なうように改変することによって得られる。

【0024】この改変タンパク質は、後記実施例において示されるようにTNF- α によって引き起こされるアポトーシスを阻害する。従って、該改変タンパク質は、ASK1が関与する生命現象の解明に用いることができる。

【0025】このような置換の例としては、K709Rが挙げられる。

【0026】塩基配列

本発明によれば、本発明によるタンパク質をコードする塩基配列が提供される。本発明によるタンパク質をコ-

ドする塩基配列の典型的配列は、配列番号2に記載されるDNA配列の一部または全部を有するものである。なお、本明細書において塩基配列とは、DNA配列およびRNA配列のいずれをも意味するものとする。

【0027】前記改変アミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は容易に定まり、配列番号1に記載されるアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明によるタンパク質をコードする塩基配列とは、配列番号2に記載のDNA配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードする配列であって縮重関係にあるコドンをDNA配列として有する配列をも意味するものとする。更にこの塩基配列は、これらに対応するRNA配列も含む。

【0028】本発明による塩基配列は、天然由来のものであっても、全合成したものであってもよい。また、天然由来のもの一部を利用して合成を行ったものであってもよい。DNAの典型的な取得方法としては、染色体ライブラリーまたはcDNAライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作成した適当なDNAプローブを用いてスクリーニングを行う方法、等が挙げられる。

【0029】本発明によるタンパク質をコードする塩基配列としては、例えば、配列番号2に記載されるDNA配列の268～4392番の配列（オープンリーディングフレームに相当）からなる配列が挙げられる。

【0030】ベクターおよび形質転換された宿主細胞
本発明によれば、前記の本発明による塩基配列を、宿主細胞内で複製可能かつその塩基配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなるベクターが提供される。更に、本発明によれば、このベクターによって形質転換された宿主細胞が提供される。この宿主ベクター系は特に限定されず、また、他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。融合タンパク質発現系としては、MBP（マルトース結合タンパク質）、GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）、HA（ヘマグルチニン）、His（ヘキサヒスチジン）、myc、Fas等を用いたものが挙げられる。

【0031】ベクターとしては、プラスミドベクター（例えば、原核細胞、酵母、昆虫細胞動物細胞等での発現ベクター）、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、センダイウイルスベクター、HIVベクター、ワクシニアウイルスベクター）、リポソームベクター（例えば、カチオニックリポソームベクター）等が挙げられる。

【0032】本発明によるベクターは、これを実際に宿主細胞に導入して所望のアミノ酸配列を発現させるためには、前記の本発明による塩基配列の他に、その発現を制御する配列や微生物、昆虫細胞または動物培養細胞等を選択するための遺伝子マーカー等を含んでいてもよ

い。また、このベクターは、本発明による塩基配列を反復した形で（例えば、タンデムリピートで）含んでいてもよい。これらは常法に従いベクターに存在させてよく、このベクターによる微生物、昆虫細胞または動物培養細胞等の形質転換の方法も、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0033】本発明によるベクター構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。また、宿主細胞としては、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、並びにCOS細胞（例えば、COS7細胞）、ミンク肺上皮細胞（例えば、Mv1Lu）、リンパ球、纖維芽細胞、CHO細胞、血液系細胞、および腫瘍細胞等のような動物細胞が挙げられる。

【0034】上記形質転換された宿主細胞を適当な培地で培養し、その培養物から本発明によるタンパク質を得ることができる。従って、本発明の別の面によれば、本発明によるタンパク質の製造法が提供される。形質転換された宿主細胞の培養およびその条件は、使用する細胞についてのそれと本質的に同様であってよい。また、培養液からの本発明によるタンパク質の回収、精製も常法に従って行うことができる。

【0035】形質転換される細胞が例えばガン患者体内的ガン細胞（例えば、白血病細胞、消化器ガン細胞、肺ガン細胞、スイ臓ガン細胞、卵巣ガン細胞、子宮ガン細胞、メラノーマ細胞、脳腫瘍細胞等）であるときは、その前記の本発明による塩基配列を含むベクターをヒトを含む生体内のガン細胞に適当な方法によって導入し、本発明によるタンパク質を発現させることにより、悪性腫瘍等について遺伝子治療を行うことができる。例えば、本発明によるタンパク質がヒトを含む生体内、特に、悪性腫瘍細胞、で発現されることにより、アポトーシスが誘導され、その結果として悪性腫瘍が退縮し、悪性腫瘍を治療することができると考えられる（後記実施例5参照）。

【0036】遺伝子治療用のベクターについては、高久史磨監修の実験医学（増刊号）第12巻、第15号「遺伝子治療の最前線」（1994年）を参照することができる。

【0037】用途／医薬組成物

本発明によるタンパク質は、プロテインキナーゼ触媒領域を有し、かつSEK1キナーゼ活性および／またはMKK3キナーゼ活性を亢進する（実施例3および4）。また、本発明によるタンパク質は、不死化細胞のアポトーシスを誘導する（実施例5）。従って、本発明によるタンパク質は、悪性腫瘍の形成および／または転移の抑制に有効であると考えられる。

【0038】従って、本発明によるタンパク質は、悪性腫瘍治療剤として用いることができる。ここで、悪性腫瘍としては、例えば、前記ガン細胞が挙げられる。

【0039】本発明による悪性腫瘍治療剤は、また、経

口または非経口投与（例えば、筋注、静注、皮下投与、直腸投与、経皮投与、経鼻投与など）、好ましくは経口投与することができ、薬剤として経口または非経口投与に適した種々の剤型で、ヒトおよびヒト以外の動物に使用される。

【0040】悪性腫瘍治療剤は、例えばその用途に応じて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、トローチ錠などの経口剤、静注および筋注などの注射剤、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤などのいずれかの製剤形態に調製することができる。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、增量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤などを用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、でん粉、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0041】薬剤中における本発明のタンパク質の含有量はその剤形に応じて異なるが、通常全組成物中約0.1～約50重量%、好ましくは約1～約20重量%濃度である。

【0042】悪性腫瘍の治療のために必要な投与量は、用法、患者の年齢、性別、症状の程度などを考慮して適宜決定されるが、通常成人1日当り約0.1～約500mg、好ましくは約0.5～約50mg程度とするのがよく、これを1日1回または数回に分けて投与することができる。

【0043】本発明によるタンパク質をコードする塩基配列は、これを有する前記ベクターを用いて標的細胞を形質転換し、悪性腫瘍の形成および／または転移を抑制する様な態様で用いることができる。すなわち、該塩基配列は悪性腫瘍遺伝子治療剤（以下、単に「遺伝子治療剤」ということがある）として用いることができる。遺伝子治療剤の投与方法、有効投与量、および含んでいてもよい担体等は悪性腫瘍治療剤のそれに準ずることができる。

【0044】本発明による遺伝子治療剤は、HVJリポソーム法（金田、実験医学、Vol.12No.2, 78(1984), 1994および森下等、実験医学、Vol.12 No.15 158(1992), 1994）、本発明による塩基配列を注射等によってそのまま投与する方法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子銃による方法（T. M. Klein et al., Bio/Technology 10, 286-291(1992)）、リポフェクション法によって投与する方

法 (Nabel et al. : Science 244, 1285, 1990)、適當なベクター (例えば、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター等) を使う方法等によって、ヒトを含むほ乳類やその他の動物に投与することができる。

【0045】本発明による遺伝子治療剤は、局所的または一時的なアポトーシスの誘導の点から、ASK1が生体内に一過的 (transient) に存在する様な態様で投与することが好ましい。このような態様としては、本発明による塩基配列を注射等によってそのまま投与する方法、リポフェクション法、HVJリポソーム法、アデノウイルスベクターを用いた方法、ワクシニアウイルスベクターを用いた方法のような非経口投与が挙げられる。

【0046】本発明による別の面によれば、本発明によるタンパク質または塩基配列の使用、特に、本発明による治療剤の製造における使用および本発明による治療剤としての使用、が提供される。

【0047】本発明による更に別の面によれば、本発明によるタンパク質または塩基配列を投与することを含んでなる、悪性腫瘍に罹ったヒトを含むほ乳類やその他の動物の治療法が提供される。この場合の有効投与量、投与方法、および投与形態等は、前記に準ずることができる。

【0048】ペプチドおよび抗体

本発明によれば、配列番号1の654～669番のアミノ酸配列からなるペプチド、および配列番号1の654～669番のアミノ酸配列を含んでなるペプチドが提供される。

【0049】配列番号1の654～669番のアミノ酸配列を含んでなるペプチドとしては、該アミノ酸配列のN末端および/またはC末端に任意のアミノ酸配列を附加したペプチドが挙げられ、これには本発明によるタンパク質も含まれる。

【0050】このペプチドは、本発明によるタンパク質に対する抗体を得るための抗原として用いることができる。また、本発明によるタンパク質は、前述のようにアポトーシスの機構に密接に関与している。従って、本発明によるペプチドは、これらの機構の解明等に有用である。

【0051】本発明によれば、前記ペプチドと特異的に反応する抗体が提供される。本発明において、抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が挙げられる。

【0052】本発明による抗体は、当業界において通常用いられる方法によって製造することができる。例えば、配列番号1に記載される前記ペプチドを、任意の担体 (例えば、ウシ血清アルブミン) とともに動物体内 (例えば、ウサギ、ヤギ、ラット、マウス、ヒツジ) に注射し、一定期間の後に、その動物の血清を精製することによって得ることができる。

【0053】本発明によるペプチドは、本発明によるタンパク質のアミノ酸配列の一部である。従って、本発明による抗体の特異的な反応 (すなわち、免疫交差反応) は、本発明によるタンパク質の存在の1つの指標となる。

【0054】従って、本発明のもう一つの面によれば、本発明による抗体と特異的に反応するタンパク質、および本発明によるタンパク質であって上記抗体と特異的に反応するもの、が提供される。

【0055】

【実施例】

実施例1 ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) 法によるASK1 cDNAのクローニングとASK1のアミノ酸配列の決定

(1) cDNAの単離

P. ten Dijke et al., Oncogene, 8, 2879 (1993)、P. Franzen et al., Cell, 75, 681 (1993)、およびP. ten Dijke et al., Science, 264, 101 (1994)に記載の方法に従って、degenerate PCR-based strategy を用いて新規のセリン/スレオニン・キナーゼcDNAの取得を試みた。その結果、受容体型セリン/スレオニン・キナーゼのファミリーとともに、より遠縁の機能不明のタンパク質キナーゼをコードするヒトcDNA断片が幾つか得られた。

【0056】まず、セリン/スレオニン・キナーゼ・ファミリーの保存されたサブドメインVIIおよびVIII (S. Hanks et al., Science, 241, 42 (1988)) を由来とするPCRプライマーのセットを用いてPCR断片を得た。これを用いて、相当するほとんど全長のcDNAクローニングを単離した (以下、このcDNAにコードされるセリン/スレオニン・キナーゼを、その特徴により、activator of SEK1 and MK3 (ASK1) と呼ぶ)。

【0057】具体的には、オリゴ(dT)を用いてプライムすることにより増幅した³²P-ラベルcDNAライブラリー (M. Poncz et al., Blood, 69, 219 (1987)) を³²P-標識PCR断片でスクリーニングした。ハイブリダイゼーションおよび陽性のバクテリオファージの精製はH. Ichijo et al., J. Biol. Chem., 268, 14505 (1993)に記載の方法に従って実施した。塩基配列の決定は、シーケナーゼDNAシーケンシング・キット (U. S. Biochemical Corp.) を用いて、両方のストランドについて実施した。得られた18クローニングの中から、最も長い3つのクローニング (クローニング20、27および72) について完全に塩基配列を決定した。クローニング72の配列は、オープン・リーディング・フレームの中間付近から始まりポリAのストレッチまで伸長して終結していた。クローニング20および27の配列は、ASK1 cDNAの5'末端

部分をカバーし、クローン72とオーバーラップする部分は配列がそれと完全に一致した。クローン20およびクローン72を合わせることにより、ASK1 cDNA配列が4533塩基対の配列からなり、268番目の塩基で始まるATGコドンに統いて4125塩基対のオープン・リーディング・フレームを含み、このオープン・リーディング・フレームには1375のアミノ酸からなるタンパク質がコードされ(図1)、このタンパク質(ASK1タンパク質)の推定分子量は154,715Daであることがわかった。

【0058】一方、クローン20の375番目のアミノ酸に相当する部位からオープン・リーディング・フレームが始まるもうひとつのクローン(クローン27)が得られた。クローン27は、ASK1 cDNAの805~808番目の4塩基が欠失しているために、イン・フレームで上流にストップ・コドンが形成されていた。

【0059】ASK1のセリン/スレオニン・キナーゼ領域はASK1タンパク質の中間に見出され、N末端とC末端に長いフランギング配列が存在していた(図1)。また、RNAプロット解析を行った結果、5キロ塩基の単一転写産物が、様々なヒト組織に発現していることがわかった(図3)。様々なヒト組織からのmRNA(クロンテック社)を用いたプロットは、ランダム・プライミングすることによって標識したASK1 cDNAをプローブとして実施した。

【0060】(2) データ・ベースによるホモロジー検索

キナーゼ領域の外側のASK1配列を用いてデータ・ベース・サーチを実施した結果、N末端の短いアミノ酸配列に、FK506結合タンパク質(FKBP)型のペプチジル・プロリル・シストランス・イソメラーゼに見られるモチーフが存在していた(図1、下線部分)。対照的に、ASK1のキナーゼ領域には、MAPKKKファミリーのメンバーのキナーゼ領域と明らかな配列のホモロジーが認められた。そのホモロジーの程度は、哺乳類のMEKK1とは30.0%、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のSSK2およびSTE11とはそれぞれ32.3%および30.4%であった。

【0061】系統進化学的な比較を行なったところ、ASK1は、哺乳類のMAPKKK(RAF-1、KSR-1、TAK-1およびTPL-2)とかなり遠縁のタンパク質であるが、酵母のMAPKKKタンパク質であり酵母のHOG1 MAPK(T. Maeda et al., Science, 269, 554 (1995))の上流の調節タンパク質であるSSK2/SSK22ファミリーに最も類縁性が高いことがわかった(図2)。

【0062】ASK1のキナーゼ領域と他のMAPKKKのキナーゼ領域との間のアミノ酸配列比較はレーザージーン・プログラム(DNASTAR社)のクラスタル(clustal)・コンピュータ・アラインメント・プログ

ラム(D. Higgins & P. Sharp, Comput. Appl. Biosci., 5, 151 (1989))を用いて実施した。

【0063】実施例2 酵母を用いたASK1キナーゼ活性の分子遺伝学的な解析

ASK1と酵母MAPKKKであるSSK2/SSK22では、全体的な構造に差異(即ち、SSK2やSSK22のキナーゼ領域はこれらのタンパク質の最もC末端部分に位置する(T. Maeda et al., Science, 269, 554 (1995))がある。しかしながら、前述のようにASK1はSSK2/SSK22と類縁性が高いことから、ASK1が酵母でキナーゼとして機能し、それによって酵母のMAPKKKの欠損を相補するという可能性があると考え、これについて検討した。

【0064】まず、ASK1をコードするcDNAを酵母発現ベクターpNV11(H. Shibuya et al., Nature, 357, 700 (1992))中に導入し、通常のYPD培地では生育できるが高浸透圧培地では生育できない酵母変異株TM257-H1(ssk2Δ ssk22Δ sho1Δ)(T. Maeda et al., Science, 269, 554 (1995))において、ASK1が、SSK2またはSSK22 MAPKKKのシグナルの欠損を回復させができるかどうかについて検討した。因みに、SHO1は、SH3領域を含む膜貫通浸透圧センサーであり、SSK2/SSK22とは独立的に、HOG1活性化を介して高浸透圧に対する種々の応答を導くもうひとつのシグナル経路に関係している。SHO1、SSK2またはSSK22に单一の変異もしくは2つの変異を有する変異株は高浸透圧培地に抵抗性を示す。しかしながら、SHO1、SSK2およびSSK22を同時に破壊すると、高浸透圧培地で酵母が生育できなくなることがわかつている。

【0065】そこで、形質転換体が1.5Mのソルビトール存在下で生育できるかどうかについて試験した(図4)。具体的には、5つの独立した形質転換体を選択し、1.5Mソルビトール存在下または非存在下でYPDプレート上で生育させた。図4は、6日間、30°Cで生育させた後にプレートを撮影した写真である。pNV11ベクター単独またはASK1(K709R)(Lys709をArgに置換することによってキナーゼ触媒活性を不活性化した変異ASK1)ベクターを用いて形質転換して得た形質転換体も同時にテストした。

【0066】その結果、ASK1を発現させると、TM257-H1が高浸透圧環境で生育できるようになったが、ベクターだけを発現させた場合やASK1(K709R)を発現させた場合には、TM257-H1が高浸透圧環境で生育できるようにならなかった(図4)。ASK1はPBS2(SHO1、SSK2およびSSK22の下流の標的タンパク質(Maeda, T. et al., Science 269, 554 (1995))が変異した酵母株では浸透圧応答を相補できなかった(データ省略)。このことより、T

M257-H1で観察されたASK1活性はPBS-HOG1シグナル経路によってメディエートされるが、HOG1活性化以外の別の経路によってはメディエートされないことが強く示唆された。

【0067】これらの結果と、酵母のHOG1に相当する哺乳類カウンターパートがp38MAPキナーゼであるという事実 (J. Rouse et al., Cell, 78, 1027 (1994); J. Han et al., Science, 265, 808 (1994); J. Lee et al., Nature 372, 739 (1994)) によって、ASK1は新規の哺乳類MAPKKKであって、MKK3をリン酸化することによりMKK3-p38のシグナル伝達経路の活性化にかかわっていることが示唆された。

【0068】実施例3 哺乳類細胞を用いたASK1キナーゼ活性の細胞生物学的な解析

ASK1が哺乳類の細胞でMAPKKKとして機能するかどうかを検討するために、ASK1プラスミドを既知のMAPKおよびMAPKK発現プラスミドとともに、COS7細胞にトランスフェクションした(図5)。MAPKおよびMAPKKのコンストラクトには全てヘマグルチニン(HA)-エピトープタグを付加し、これらをASK1とともに、またはASK1なしに発現させ、抗HA抗体を用いて免疫沈降した。具体的には、下記に記載した方法に従って実施した。

【0069】アフリカツメガエル(*Xenopus*)のMAPK (Y. Gotoh et al., EMBO J., 10, 2661 (1991))およびアフリカツメガエルMAPKK (H. Kosako et al., EMBO J., 12, 787 (1993))のcDNAは、過去に記載の方法に従ってクローニングした。ラットSAPK α (J. Kyriakis et al., Nature, 369, 156 (1994))、ヒトp38 (J. Han et al., Biochim. Biophys. Acta, 1265, 224 (1995))、マウスSEK1 (I. Sanchez et al., Nature, 372, 794 (1994))およびヒトMKK3 (B. Derijard et al., Science, 267, 682 (1995))のコーディング領域はPCR法によって増幅した。HAタグを哺乳類用発現ベクターpSR α 456 (Y. Takebe et al., Mol. Cell. Biol., 8, 466 (1988))のBglI-EcoRI部位中に導入することによって、pSR α -HA1を構築した。MAPK、SAPK α 、p38、MAPKK、SEK1、およびMKK3のcDNAを、pSR α -HA1のBglI-EcoRI部位中にサブクローニングした。ASK1cDNAは別の哺乳類用発現ベクターpcDNA3(インビトロジェン社)中に導入した。一過的に発現させるために、COS7細胞を製造業者(ライフ・テクノロジー社)の使用説明書に従って、リポフェクトアミンを用いてトランスフェクトした。抽出液を調製するために、バッファー溶液(20mM Tris-HCl (pH 7.5)、12mM β -グリセロホスフェート、150mM NaCl、5mM EGTA、10mM NaF、1% Triton X-100、0.5% デオキシコレート、3mM ジ

チオスレイトール(DTT)、1mM バナジン酸ナトリウム、1mM フェニルメチルスルホニル・フルオライド(PMSF)、20 μ g/ml アプロチニン)中で細胞をリシスした。細胞抽出液を15,000×gで10分間遠心分離して懸濁を除いた。

【0070】免疫沈降を行なうために、上清を抗HAモノクローナル抗体(12CA5)とともに、1時間、4°Cでインキュベートした。プロテインA-セファロース(ファルマシア・バイオテク社)を添加した後、ライゼートをさらに1時間インキュベートした。ビーズを、溶液(500mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EGTA、2mMDTT、1mM PMSF)を用いて2回洗浄した後、溶液(150mM NaCl、20mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EGTA、2mMDTT、1mM PMSF)を用いてさらに2回洗浄した後、キナーゼ・アッセイにかけた。

【0071】沈降させた免疫複合体をリン酸化アッセイにかけた。アッセイに際しては、基質タンパク質を外から加えた。ここで用いた基質タンパク質は、MAPKに対してはミエリン塩基性タンパク質(MBP)(シグマ社)、SAPKに対してはc-Jun、p38に対してはATF-2、MAPKKに対してはキナーゼ・ネガティブMAPK、SEK1およびMKK3に対してはキナーゼ・ネガティブp38(MPK2)とした。ここで用いたATF2は過去に記載の方法(S. Gupta et al., Science 267, 389-393(1995))に従って調製した。ヘキサヒスチジン(His)-タグを融合したc-Jun (S. Matsuda et al., J. Biol. Chem., 270, 12781 (1995))およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)を融合したキナーゼ・ネガティブのアフリカツメガエルMAPK(K57D)はH. Kosako et al., EMBO J., 12, 787 (1993)に記載の方法に従って調製した。ヒトp38に対するアフリカツメガエルのカウンターパートであるMPK2 (J. Rouse et al., Cell, 78, 1027 (1994))は、SEK1およびMKK3の基質タンパク質としてアッセイに使用した。

【0072】His-タグと融合したキナーゼ・ネガティブのMPK2(K54R)はT. Moriguchi et al., J. Biol. Chem., 270, 12969 (1995)に記載の方法に従って調製した。MBP、c-Jun、ATF2、キナーゼ・ネガティブMAPKおよびキナーゼ・ネガティブMPK2をリン酸化する活性を測定するために、免疫複合体を、それぞれの基質タンパク質(各3 μ g)とともに、最終量25 μ lの溶液(20mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、100 μ M [γ -³²P]ATP (0.3 μ Ci))中で30分間、30°Cでインキュベートした。反応は、Laemmli'sサンプル・バッファーの添加後、煮沸することによって停止した。SDS-ポリアクリラミド電気泳動(PA

GE)を行なった後、これらのタンパク質のリン酸化をイメージ・アライザー(Fuji XBAS 2000)を用いて定量した。

【0073】その結果、ASK1の発現によって、SAPKおよびp38 MAPキナーゼはそれぞれ7.6倍および5.0倍活性化された。MAPKでは極めて弱い活性化しか観察されなかつた(図5)。また、ASK1によって、MKK3およびSEK1はそれぞれ11.8倍および7.0倍まで活性化された。これに対してMAPKKの活性化は全く検出されなかつた(図5)。

【0074】実施例4 インビトロでの組換えタンパク質を用いたカップル・キナーゼ・アッセイ

図5で観察されたMKK3の活性化がASK1による直接的な効果かどうかを検討するため、組換えSEK1、MKK3、MAPKK6および組換えキナーゼ・ネガティブp38(MPK2)タンパク質を用いてインビトロ・キナーゼ・アッセイを実施した。本実施例では、実施例3に記載の方法に準じて、COS7細胞中に発現させたASK1を抗ASK1ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降させ、免疫複合体をASK1酵素標品とした。免疫沈降に用いた抗ASK1ポリクローナル血清は、ASK1のアミノ酸654~669に相当するペプチド配列(TEEKGRSTEEGDCESD)に対するもので、H. Ichijo et al., J. Biol. Chem., 270, 7420 (1995)に記載の方法に従って、グルタルアルデヒド法を用いてKeyhole limpet hemocyaninとカップルさせ、Freund's adjuvantと混合し、ウサギを免疫して作製したものである。この免疫複合体とともに、組換え型SEK1、MKK3、MAPKK6と組換え型キナーゼ・ネガティブp38タンパク質を用いて、下記に記載する方法に従って、カップル・キナーゼ・アッセイを実施した。

【0075】Y. Gotoh et al., Oncogene, 9, 1891 (1994)に記載の方法に従って、His-タグを附加したアフリカツメガエルMAPKKおよびヒトMKK3を大腸菌で発現し、精製した。免疫複合体がMAPKKまたはMKK3を活性化する活性を測定するために、まず0.2μgのHis-MAPKKまたはHis-MKK3を免疫複合体とともに、最終量25μlの溶液(20mM

Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、100μM ATP)中で15分間、30°Cでインキュベートした。次いで、0.3μCiの[γ-³²P]ATPおよび3μgのGST-キナーゼ・ネガティブMAPK(MAPKKに対して)またはHis-キナーゼ・ネガティブMPK2(MKK3に対して)を同一のバッファー(最終量、35μl)中で7分間、25°Cでインキュベートした。その後、サンプルをSDS-PAGEにかけ、イメージ・アライザーで解析した。結果は図6に示される通りであった。

【0076】COS7細胞からのASK1の免疫沈降物は、SEK1、MKK3およびMAPKK6活性を強く

(それぞれ40倍以上)活性化し、ASK1がキナーゼ・アッセイに存在しているときにのみp38のリン酸化が観察された。さらに野生型p38およびATF2を用いることによってASK1依存的なp38のリン酸化が、p38の活性化を誘導することを確認した。対照的に、MAPKKについては、MAPKKが存在していても弱い活性化(2.2倍)が観察されただけであった。

【0077】一方、RafをMAPKKとしてポジティブ・コントロールに用いた場合には、27.8倍のMAPKKの活性化が観察された(データ省略)。以上の結果(実施例4)および実施例3の結果より、ASK1は新規のMAPKKであり、SEK1-SAPK経路およびMKK3/MAPKK6-p38経路を選択的に活性化することが示された。

【0078】実施例5 ASK1発現によるアポトーシスの誘導

(1) ASKの発現の確認

メタロチオネイン・プロモーターをベースとした発現プラスミドを安定的にトランスフェクトしたミンク肺上皮細胞株(Mv1Lu)を用いることによって、ASK1の生物活性を検討した。構成的に発現したASK1が細胞死を誘導し、結果として安定な形質転換体の取得に失敗するという可能性を排除するために、メタロチオネイン誘導性プロモーター・システムを用いた。

【0079】まず、ASK1およびASK1(K709R)cDNAをpMEP4ベクター(インビトロジェン社)中の制限酵素切断部位にサブクローニングした。cDNAのトランスフェクションは、トランスフェクタム(プロメガ社)を用いて、製造業者の使用説明書に従って実施した。ハイグロマイシンBによる選択は、M. Saitoh et al., J. Biol. Chem., 271, 2769 (1996)に記載の方法に従って実施した。独立したクローニングを幾つかリーニング・クローニングし、ASK1タンパク質の発現を抗ASK1血清を用いた免疫沈降(H. Ichijo et al., J. Biol. Chem., 268, 14505 (1993))によって決定した。独立した陽性のクローニング2つを下記に記載のアッセイに用いたが、どちらのクローニングを用いても結果は本質的に同じであった。

【0080】[³⁵S]メチオニンおよび[³⁵S]システイン混合液を用いて、100μM ZnCl₂存在下または非存在下で5時間、細胞を代謝標識した。次いで、細胞のライゼートを特異的な抗ASK1抗血清を用いた免疫沈降にかけ、その後SDS-PAGEおよびフルオログラフィーを用いた解析を行なった。

【0081】結果は図7に示した通りであった。即ち、ZnCl₂によって誘導したときにのみ、ASK1が強く発現することがわかった。ASK1(K709R)をトランスフェクションした細胞も同じ程度の組換え型タンパク質を発現していることがわかった。

【0082】(2) チミジンの取り込みへの効果

ASK 1が細胞増殖に何らかの効果を示すかどうかを検討するために、ベクター単独（図8、黒四角）、ASK 1（図8、黒丸）およびASK 1（K709R）（図8、白丸）を用いて安定的にトランスフェクトしたMv1Lu細胞を、1%ウシ胎児血清（FBS）と図示した濃度のZnC1₂を含むMEM培地で16時間インキュベートした。その後、細胞を [³H]チミジンを用いて1時間パルスラベルし、DNA中に取り込まれた [³H]放射能活性を液体シンチレーション・カウンターによって測定した。結果は図8に示される通りであった。

【0083】ASK 1をトランスフェクトした細胞では [³H]チミジンの取り込みの劇的な抑制が観察された。これに対して、ベクターのみをトランスフェクトした細胞やASK 1（K709R）ベクターでトランスフェクトした細胞では、 [³H]チミジンの取り込みの抑制は観察されなかった（図8）。

【0084】ZnC1₂による用量依存的な [³H]チミジンの取り込みの抑制と、ASK 1の用量依存的な発現と活性化との相関性について検討した。ASK 1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞を、様々な量のZnC1₂で5時間処理した後、免疫沈降によってASK 1の発現レベルを決定した（図9上段）。また、細胞を様々な量のZnC1₂で5時間処理し、免疫沈降によってASK 1を細胞から回収した後、MKK3-MPK2カップル・キナーゼ・アッセイにかけた（図9下）。その結果、ZnC1₂による用量依存的な [³H]チミジンの取り込みの抑制は、ASK 1の用量依存的な発現と活性化によく相関していた（図9）。

【0085】(3) SAPKおよびp38のキナーゼ活性の亢進への効果

次に、ASK 1活性と内在性のSAPKおよびp38の活性化との相関性を検討するために下記の実験を実施した。ASK 1を安定的にトランスフェクトしたMv1Lu細胞を、図示した濃度のZnC1₂と5時間インキュベートした。SAPKの活性を測定するために、S.Matsuda et al., J. Biol. Chem., 270, 12781 (1995)に記載の方法に従って、各々の細胞抽出液をc-Junを基質タンパク質として含むポリアクリルアミドゲル内のキナーゼ検出アッセイ（インーグルキナーゼ・アッセイ）にかけた。p38の活性を検出するために、抗p38ポリクローナル抗体（C-20、サンタ・クルーズ社）を用いて、0.1% SDS存在下で免疫沈降を実施した以外は実施例3に記載の方法に準じて、免疫沈降した。その後、ATF2を基質タンパク質として用いてキナーゼ活性を検出した。結果は図10に示される通りであった。内在性のSAPKおよびp38も、ASK 1活性と相関して活性化されていることがわかった。

【0086】(4) 細胞の形態変化およびDNAの断片化への効果

さらに、100μM ZnC1₂によって細胞を処理し、ASK 1を継続的に発現させたところ、ZnC1₂添加後6時間以内に形態変化（すなわち、cytoplasmic shrinkage およびcellular condensation）が誘導されることがわかった（データ省略）。このような形態変化は、ASK 1（K709）を発現させた細胞では観察されなかった。細胞を、100μM ZnC1₂の存在下または非存在下で、1%FBSを含むMEMと26時間インキュベートした。アポトーシスを起こしている細胞に典型的な特徴であるcytoplasmic shrinkage およびcellular condensationが、長時間誘導（26時間）の後、最も著しくなった（図11上段）。

【0087】ASK 1によってアポトーシスによる細胞死が誘導されるかどうかについて、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ-メディエイテッド dUTPニック・エンド・ラベリング（TUNEL）法によって細胞を insitu 染色することにより（図11下段）、およびゲノミックDNA断片化により検討した。具体的には、ASK 1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞を100μM ZnC1₂存在下または非存在下で、FBSを含まないMEM培地で25時間培養した。その後、insitu細胞死検出キット（ベーリングー・マンハイム社）を用いてTUNEL法で染色（図11下段）、あるいはトータルDNAを単離し、2%アガロースゲル電気泳動にかけた（図12）。その結果、ZnC1₂によるASK 1発現の誘導後に、アポトーシスおよびDNA断片化が観察された（図11下段および図12）。

【0088】実施例6 TNF α によるASK 1の活性化

本実施例では、TNF α で細胞を処理することによって、ASK 1が活性化されるかどうかを検討した。ASK 1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞を、50μM ZnC1₂で5時間前処理し、ASK 1発現を誘導した。その後、100ng/mlのTNF α で様々な時間細胞を刺激した。TNF α で処理した細胞由来のASK 1免疫沈降物を、MKK3およびキナーゼ・ネガティブp38を用いたカップル・キナーゼ・アッセイにかけた（図13上段および下段および図14）。

【0089】その結果、TNF α は、ASK-1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞において刺激後5分以内にASK 1活性を活性化した（図13上段および下段）。TNF α によるASK 1活性化は用量依存的な様式で観察された（図14）。次に、ASK 1をトランスフェクトしていない293細胞およびA673細胞を100ng/mlのTNF- α で処理した。その結果、TNF- α によってアポトーシスが誘導されることが知られている（データ省略）様々なタイプの細胞、即ちヒト293胎児腎臓細胞、A673ラブドミオサルコーマ（rhabdomyosarcoma）細胞（図13下段）、Jurkat T細

胞およびK B上皮性カルシノーマ細胞（データ省略）において、内在性のASK1もまたTNF- α によって活性化された。

【0090】さらに、ASK1（K709R）を一過性に293細胞（図15）あるいはJurkat T細胞（図16）にトランスフェクトさせた。具体的には下記に記載の方法に従って実験を実施した。293細胞（ 2×10^6 ）を、2 μ gのpcDNA3コントロール・ベクターまたはpcDNA3-ASK1（K709R）で、Tfx-50（Promega社）を用いて製造業者のプロトコールに従って一過性にトランスフェクトさせた。トランスフェクションの8時間後より、細胞をTNF- α （100ng/ml）で、300nMのアクチノマイシンD（ActD）の存在下または非存在下で、16時間処理した。培養プレートより遊離したアポトーシスを起こした細胞を回収し、トータルDNAを単離し、2%アガロース・ゲル電気泳動によって解析した（図15）。

【0091】また、pcDNA3-ASK1（K709R）をJurkat細胞に、DMRIE-Cリエージェント（Life Technologies社）によって、pHock-1プラスミド（Invitrogen社）とともにトランスフェクトした。因みに、pHock-1プラスミドには、ハプテンpHOx（4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one）に対する単鎖抗体融合タンパク質がコードされている。従って、pHOxをコートした磁石ビーズを用いることによって、トランスフェクトされた細胞を選択的に単離することが可能である。ASK1（K709R）をトランスフェクトした細胞のポピュレーション（ β -ガラクトシダーゼ染色によって測定したコトランスフェクションの効率はほとんど100%であった）を、pHOxをコートした磁石ビーズによって、Capture-Tec kit（Invitrogen社）を用いて単離した後、細胞を様々な濃度のTNF- α とともに5時間培養し

配列

Met	Ser	Thr	Glu	Ala	Asp	Glu	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Val	Pro	Pro	Phe
1								10							
Ala	Pro	Ser	Gly	Phe	Cys	Thr	Ile	Pro	Glu	Gly	Gly	Ile	Cys	Arg	Arg
								20							30
Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Glu	Gly	Glu	Glu	His	Gln	Leu	Pro	Pro
								35							45
Pro	Pro	Pro	Gly	Ser	Phe	Trp	Asn	Val	Glu	Ser	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly
								50							55
Ile	Gly	Cys	Pro	Ala	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Arg	Gly	Arg	
								65							70
Gly	Ser	Ser	Val	Gly	Gly	Ser	Arg	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Ala	Tyr	Val
								85							90
Ile	Asn	Glu	Ala	Ser	Gln	Gly	Gln	Leu	Val	Val	Ala	Glu	Ser	Glu	Ala
								100							105
Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	Glu	Ala	Cys	Glu	Thr	Val	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu
								115							120
															125

た。細胞質の小さく断片化したDNAを、過去に記載の方法（Selins, K. & Cohen, J., J. Immunol. 139, 3199 (1987)）を若干改良した方法によって単離した。 3×10^6 細胞を200 μ lの緩衝溶液（20mM Tris-HCl（pH 7.5），10mM EDTA，0.5% Triton X-100）でリシスした。得られたライゼートを、0.2mg/mlのProtease Kと0.1mg/mlのRNase Nとともに、42°Cで1時間インキュベートした。その後、DNAをエタノール抽出後にフェノール/クロロホルム抽出によって精製した。抽出した細胞質DNAを2%アガロース・ゲル電気泳動によって解析した（図16）。

【0092】その結果、TNF- α によるDNA断片化は効率的に減少した。尚、DNA断片化アッセイにおいて、トランスフェクトされていないJurkat細胞および単離したJurkat細胞（pHock-1および対照のpcDNA3プラスミドでトランスフェクトしたもの）は同様にTNF- α に感受性であった（データ省略）。このことより、ASK1（K709R）がドミナント・ネガティブ変異体として機能することが示唆されたとともに、より重要な事には、TNF- α によって誘導されるアポトーシスにASK1が必須であることが示唆された。

【0093】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1375

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源：

生物名：ヒト

Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp
 130 135 140
 Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe
 145 150 155 160
 Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser
 165 170 175
 Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu
 180 185 190
 Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly
 195 200 205
 Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr
 210 215 220
 Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro
 225 230 235 240
 Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg
 245 250 255
 Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln Ala Ser Ser Gln Tyr Phe
 260 265 270
 Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr
 275 280 285
 Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp
 290 295 300
 Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser
 305 310 315 320
 Tyr Arg Asp Ile Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Val Lys Leu Val Glu Thr
 325 330 335
 Leu Glu Lys Leu Pro Thr Phe Asp Leu Ala Ser His His Val Lys
 340 345 350
 Phe His Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Arg Arg Asn Leu Pro Gly Asp Arg
 355 360 365
 Ala Lys Ala Leu Asp Ile Met Ile Pro Met Val Gln Ser Glu Gly Gln
 370 375 380
 Val Ala Ser Asp Met Tyr Cys Leu Val Gly Arg Ile Tyr Lys Asp Met
 385 390 395 400
 Phe Leu Asp Ser Asn Phe Thr Asp Thr Glu Ser Arg Asp His Gly Ala
 405 410 415
 Ser Trp Phe Lys Ala Phe Glu Ser Glu Pro Thr Leu Gln Ser Gly
 420 425 430
 Ile Asn Tyr Ala Val Leu Leu Leu Ala Ala Gly His Gln Phe Glu Ser
 435 440 445
 Ser Phe Glu Leu Arg Lys Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 450 455 460
 Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe
 465 470 475 480
 Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn Asp His Met Arg Val Ile Gln
 485 490 495
 Ala Ser Glu Lys Leu Phe Lys Leu Lys Thr Pro Ala Trp Tyr Leu Lys
 500 505 510
 Ser Ile Val Glu Thr Ile Leu Ile Tyr Lys His Phe Val Lys Leu Thr
 515 520 525

Thr Glu Gln Pro Val Ala Lys Gln Glu Leu Val Asp Phe Trp Met Asp
 530 535 540
 Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp Val Thr Val Val Arg Phe Pro
 545 550 555 560
 Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser
 565 570 575
 Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ile Trp His Val Leu
 580 585 590
 Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser
 595 600 605
 Val Arg Gly Val Ser Ile Ser Lys Phe Glu Glu Arg Cys Cys Phe Leu
 610 615 620
 Tyr Val Leu His Asn Ser Asp Asp Phe Gln Ile Tyr Phe Cys Thr Glu
 625 630 635 640
 Leu His Cys Lys Lys Phe Phe Glu Met Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu
 645 650 655
 Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly Asp Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu
 660 665 670
 Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys
 675 680 685
 Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val
 690 695 700
 Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln
 705 710 715 720
 Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His Lys His Leu Lys His Lys Asn
 725 730 735
 Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile
 740 745 750
 Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser Leu Tyr Ala Leu Leu Arg Ser
 755 760 765
 Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr
 770 775 780
 Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val
 785 790 795 800
 His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly
 805 810 815
 Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile
 820 825 830
 Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro
 835 840 845
 Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile
 850 855 860
 Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro
 865 870 875 880
 Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met
 885 890 895
 Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys
 900 905 910
 Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys

915	920	925
Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys		
930	935	940
Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Ala		
945	950	955
Glu Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro Val Pro Val Leu Val Glu Asp		
965	970	975
Thr Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu		
980	985	990
Lys Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu		
995	1000	1005
Arg Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu Phe Leu Gly Ile Pro Asp Glu		
1010	1015	1020
Asn Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro Ser Pro Glu Glu Lys Asp Ser		
1025	1030	1035
Gly Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser Glu Arg Arg Ala Thr Leu His		
1045	1050	1055
Arg Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys Ile Val Arg Asn Leu Met Glu		
1060	1065	1070
Ser Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro Lys Leu Lys Trp Glu His Ile		
1075	1080	1085
Thr Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu Phe Val Arg Ser Thr Asp Arg		
1090	1095	1100
Lys Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe		
1105	1110	1115
Asp Ser His Gly Ile Ser Gln Val Gln Val Val Leu Phe Gly Phe Gln		
1125	1130	1135
Asp Ala Val Asn Lys Val Leu Arg Asn His Asn Ile Lys Pro His Trp		
1140	1145	1150
Met Phe Ala Leu Asp Ser Ile Ile Arg Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile		
1155	1160	1165
Thr Ile Leu Val Pro Glu Leu Arg Pro His Phe Ser Leu Ala Ser Glu		
1170	1175	1180
Ser Asp Thr Ala Asp Gln Glu Asp Leu Asp Val Glu Asp Asp His Glu		
1185	1190	1195
Glu Gln Pro Ser Asn Gln Thr Val Arg Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu		
1205	1210	1215
Asp Ala Val Ala Thr Ser Gly Val Ser Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser		
1220	1225	1230
His Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg		
1235	1240	1245
Met Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu Leu Val Arg Lys Glu		
1250	1255	1260
Lys Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg Ala Ile Glu Glu Lys Asp Gln		
1265	1270	1275
Glu Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Ile Glu Ile Pro Glu		
1285	1290	1295
Leu Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser Gly Thr Asn Ile Glu Asp Ser		
1300	1305	1310

Glu Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn Gly Ala Asp Glu Asp Thr Ile
 1315 1320 1325
 Ser Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr Leu Leu Asp Val Leu Tyr Tyr
 1330 1335 1340
 Val Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu
 1345 1350 1355 1360
 Cys Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile Asp Phe Arg Asn Lys Gln Thr
 1365 1370 1375

【 0094 】配列番号 : 2

配列の長さ : 4533

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

起源 :

生物名 : ヒト

配列

ACCGGCTTC CCCACCCCTT GTACTCTAAA CTCTGCAGAG GGCGAGGTG CGGCCACGGA 60
 GGCGCCGAGG AGGAGCGAGC GCCGCCGGGC AGCGCGTGC CCTCGGGGGA GAGGGCGCCG 120
 GAGAGGAGGC GGCGCGCGGG CGCGCAGGGC GCGCGCGCG ATGGCAGCTG CTTAGCCCCG 180
 CGGGCGCGGA GCAGCCCCGA GCTGTGGCTG GCCAGGCGGT GCGGCTGGC GGGGACGCC 240
 GCCGCCGTTG CTGCCCGGCC CGGAGAG ATG AGC ACG GAG GCG GAC GAG GGC ATC 294
 Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile
 1 5

ACT TTC TCT GTG CCA CCC TTC GCC CCC TCG GGC TTC TGC ACC ATC CCC 342
 Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro
 10 15 20 25
 GAG GGC GGC ATC TGC AGG AGG GGA GGA GCG GCG GCG GTG GGC GAG GGC 390
 Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly
 30 35 40
 GAG GAG CAC CAG CTG CCA CCG CCG CCG GGC AGT TTC TGG AAC GTG 438
 Glu Glu His Glu Leu Pro Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val
 45 50 55
 GAG AGC GCC GCT GCC CCT GGC ATC GGT TGT CCG GCG GCC ACC TCC TCG 486
 Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser
 60 65 70
 AGC AGT GCC ACC CGA GGC CGG GGC AGC TCT GTT GGC GGG GGC AGC CGA 534
 Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg Gly Ser Ser Val Gly Gly Ser Arg
 75 80 85
 CGG ACC ACG GTG GCA TAT GTG ATC AAC GAA GCG AGC CAA GGG CAA CTG 582
 Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu
 90 95 100 105
 GTG GTG GCC GAG AGC GAG GCC CTG CAG AGC TTG CGG GAG GCG TGC GAG 630
 Val Val Ala Glu Ser Glu Ala Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu
 110 115 120
 ACA GTG GGC GCC ACC CTG GAA ACC CTG CAT TTT GGG AAA CTC GAC TTT 678
 Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe
 125 130 135
 GGA GAA ACC ACC GTG CTG GAC CGC TTT TAC AAT GCA GAT ATT GCG GTG 726
 Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 GTG GAG ATG AGC GAT GCC TTC CGG CAG CCG TCC TTG TTT TAC CAC CTT 774
 Val Glu Met Ser Asp Ala Phe Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu
 155 160 165

GGG GTG AGA GAA AGT TTC AGC ATG GCC AAC AAC ATC ATC CTC TAC TGC	822
Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys	
170 175 180 185	
GAT ACT AAC TCG GAC TCT CTG CAG TCA CTG AAG GAA ATC ATT TGC CAG	870
Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln	
190 195 200	
AAG AAT ACT ATG TGC ACT GGG AAC TAC ACC TTT GTT CCT TAC ATG ATA	918
Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile	
205 210 215	
ACT CCA CAT AAC AAA GTC TAC TGC TGT GAC AGC AGC TTC ATG AAG GGG	966
Thr Pro His Asn Lys Val Tyr Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly	
220 225 230	
TTG ACA GAG CTC ATG CAA CCG AAC TTC GAG CTG CTT CTT GGA CCC ATC	1014
Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile	
235 240 245	
TGC TTA CCT CTT GTG GAT CGT TTT ATT CAA CTT TTG AAG GTG GCA CAA	1062
Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln	
250 255 260 265	
GCA AGT TCT AGC CAG TAC TTC CGG GAA TCT ATA CTC AAT GAC ATC AGG	1110
Ala Ser Ser Ser Gln Tyr Phe Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg	
270 275 280	
AAA GCT CGT AAT TTA TAC ACT GGT AAA GAA TTG GCA GCT GAG TTG GCA	1158
Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala	
285 290 295	
AGA ATT CGG CAG CGA GTA GAT AAT ATC GAA GTC TTG ACA GCA GAT ATT	1206
Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile	
300 305 310	
GTC ATA AAT CTG TTA CTT TCC TAC AGA GAT ATC CAG GAC TAT GAT TCT	1254
Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser Tyr Arg Asp Ile Gln Asp Tyr Asp Ser	
315 320 325	
ATT GTG AAG CTG GTA GAG ACT TTA GAA AAA CTG CCA ACC TTT GAT TTG	1302
Ile Val Lys Leu Val Glu Thr Leu Glu Lys Leu Pro Thr Phe Asp Leu	
330 335 340 345	
GCC TCC CAT CAC CAT GTG AAG TTT CAT TAT GCA TTT GCA CTG AAT AGG	1350
Ala Ser His His Val Lys Phe His Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Arg	
350 355 360	
AGA AAT CTC CCT GGT GAC AGA GCA AAA GCT CTT GAT ATT ATG ATT CCC	1398
Arg Asn Leu Pro Gly Asp Arg Ala Lys Ala Leu Asp Ile Met Ile Pro	
365 370 375	
ATG GTG CAA AGC GAA GGA CAA GTT GCT TCA GAT ATG TAT TGC CTA GTT	1446
Met Val Gln Ser Glu Gly Gln Val Ala Ser Asp Met Tyr Cys Leu Val	
380 385 390	
GGT CGA ATC TAC AAA GAT ATG TTT TTG GAC TCT AAT TTC ACG GAC ACT	1494
Gly Arg Ile Tyr Lys Asp Met Phe Leu Asp Ser Asn Phe Thr Asp Thr	
395 400 405	
GAA AGC AGA GAC CAT GGA GCT TCT TGG TTC AAA AAG GCA TTT GAA TCT	1542
Glu Ser Arg Asp His Gly Ala Ser Trp Phe Lys Lys Ala Phe Glu Ser	
410 415 420 425	
GAG CCA ACA CTA CAG TCA GGA ATT AAT TAT GCG GTC CTC CTC CTG GCA	1590
Glu Pro Thr Leu Gln Ser Gly Ile Asn Tyr Ala Val Leu Leu Ala	

430	435	440	
GCT GGA CAC CAG TTT GAA TCT TCC TTT GAG CTC CGG AAA GTT GGG GTG			1638
Ala Gly His Gln Phe Glu Ser Ser Phe Glu Leu Arg Lys Val Gly Val			
445	450	455	
AAG CTA AGT AGT CTT CTT GGT AAA AAG GGA AAC TTG GAA AAA CTC CAG			1686
Lys Leu Ser Ser Leu Leu Gly Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln			
460	465	470	
AGC TAC TGG GAA GTT GGA TTT TTT CTG GGG GCC AGC GTC CTA GCC AAT			1734
Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn			
475	480	485	
GAC CAC ATG AGA GTC ATT CAA GCA TCT GAA AAG CTT TTT AAA CTG AAG			1782
Asp His Met Arg Val Ile Gln Ala Ser Glu Leu Phe Lys Leu Lys			
490	495	500	505
ACA CCA GCA TGG TAC CTC AAG TCT ATT GTA GAG ACA ATT TTG ATA TAT			1830
Thr Pro Ala Trp Tyr Leu Lys Ser Ile Val Glu Thr Ile Leu Ile Tyr			
510	515	520	
AAG CAT TTT GTG AAA CTG ACC ACA GAA CAG CCT GTG GCC AAG CAA GAA			1878
Lys His Phe Val Lys Leu Thr Thr Glu Gln Pro Val Ala Lys Gln Glu			
525	530	535	
CTT GTG GAC TTT TGG ATG GAT TTC CTG GTC GAG GCC ACA AAG ACA GAT			1926
Leu Val Asp Phe Trp Met Asp Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp			
540	545	550	
GTT ACT GTG GTT AGG TTT CCA GTA TTA ATA TTA GAA CCA ACC AAA ATC			1974
Val Thr Val Val Arg Phe Pro Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile			
555	560	565	
TAT CAA CCT TCT TAT TTG TCT ATC AAC AAT GAA GTT GAG GAA AAG ACA			2022
Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr			
570	575	580	585
ATC TCT ATT TGG CAC GTG CTT CCT GAT GAC AAG AAA GGT ATA CAT GAG			2070
Ile Ser Ile Trp His Val Leu Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu			
590	595	600	
TGG AAT TTT AGT GCC TCT TCT GTC AGG GGA GTG AGT ATT TCT AAA TTT			2118
Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser Val Arg Gly Val Ser Ile Ser Lys Phe			
605	610	615	
GAA GAA AGA TGC TGC TTT CTT TAT GTG CTT CAC AAT TCT GAT GAT TTC			2166
Glu Glu Arg Cys Cys Phe Leu Tyr Val Leu His Asn Ser Asp Asp Phe			
620	625	630	
CAA ATC TAT TTC TGT ACA GAA CTT CAT TGT AAA AAG TTT TTT GAG ATG			2214
Gln Ile Tyr Phe Cys Thr Glu Leu His Cys Lys Lys Phe Phe Glu Met			
635	640	645	
GTG AAC ACC ATT ACC GAA GAG AAG GGG AGA AGC ACA GAG GAA GGA GAC			2262
Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly Asp			
650	655	660	665
TGT GAA AGT GAC TTG CTG GAG TAT GAC TAT GAA TAT GAT GAA AAT GGT			2310
Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly			
670	675	680	
GAC AGA GTC GTT TTA GGA AAA GGC ACT TAT GGG ATA GTC TAC GCA GGT			2358
Asp Arg Val Val Leu Gly Lys Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly			
685	690	695	
CGG GAC TTG AGC AAC CAA GTC AGA ATT GCT ATT AAG GAA ATC CCA GAG			2406

Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro Glu			
700	705	710	
AGA GAC AGC AGA TAC TCT CAG CCC CTG CAT GAA GAA ATA GCA TTG CAT			2454
Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His			
715	720	725	
AAA CAC CTG AAG CAC AAA AAT ATT GTC CAG TAT CTG GGC TCT TTC AGT			2502
Lys His Leu Lys His Lys Asn Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser			
730	735	740	745
GAG AAT GGT TTC ATT AAA ATC TTC ATG GAG CAG GTC CCT GGA GGA AGT			2550
Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser			
750	755	760	
CTT TAT GCT CTC CTT CGT TCC AAA TGG GGT CCA TTA AAA GAC AAT GAG			2598
Leu Tyr Ala Leu Leu Arg Ser Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu			
765	770	775	
CAA ACA ATT GGC TTT TAT ACA AAG CAA ATA CTG GAA GGA TTA AAA TAT			2646
Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr			
780	785	790	
CTC CAT GAC AAT CAG ATA GTT CAC CGG GAC ATA AAG GGT GAC AAT GTG			2694
Leu His Asp Asn Gln Ile Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val			
795	800	805	
TTG ATT AAT ACC TAC AGT GGT GTT CTC AAG ATC TCT GAC TTC GGA ACA			2742
Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr			
810	815	820	825
TCA AAG AGG CTT GCT GGC ATA AAC CCC TGT ACT GAA ACT TTT ACT GGT			2790
Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly			
830	835	840	
ACC CTC CAG TAT ATG GCA CCA GAA ATA ATA GAT AAA GGA CCA AGA GGC			2838
Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly			
845	850	855	
TAC GGA AAA GCA GCA GAC ATC TGG TCT CTG GGC TGT ACA ATC ATT GAA			2886
Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu			
860	865	870	
ATG GCC ACA GGA AAA CCC CCA TTT TAT GAA CTG GGA GAA CCA CAA GCA			2934
Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala			
875	880	885	
GCT ATG TTC AAG GTG GGA ATG TTT AAA GTC CAC CCT GAG ATC CCA GAG			2982
Ala Met Phe Lys Val Gly Met Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu			
890	895	900	905
TCC ATG TCT GCA GAG GCC AAG GCA TTC ATA CTG AAA TGT TTT GAA CCA			3030
Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro			
910	915	920	
GAT CCT GAC AAG AGA GCC TGT GCT AAC GAC TTG CTT GTT GAT GAG TTT			3078
Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe			
925	930	935	
TTA AAA GTT TCA AGC AAA AAG AAA AAG ACA CAA CCT AAG CTT TCA GCT			3126
Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala			
940	945	950	
CTT TCA GCT GGA TCA AAT GCA GAA TAT CTC AGG AGT ATA TCC TTG CCG			3174
Leu Ser Ala Gly Ser Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro			
955	960	965	

GTA CCT GTG CTG GTG GAG GAC ACC AGC AGC AGC AGT GAG TAC GGC TCA	3222
Val Pro Val Leu Val Glu Asp Thr Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser	
970 975 980 985	
GTT TCA CCC GAC ACG GAG TTG AAA GTG GAC CCC TTC TCT TTC AAA ACA	3270
Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu Lys Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr	
990 995 1000	
AGA GCC AAG TCC TGC GGA GAA AGA GAT GTC AAG GGA ATT CGG ACA CTC	3318
Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu Arg Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu	
1005 1010 1015	
TTT TTG GGC ATT CCA GAT GAG AAT TTT GAA GAT CAC AGT GCT CCT CCT	3366
Phe Leu Gly Ile Pro Asp Glu Asn Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro	
1020 1025 1030	
TCC CCT GAA GAA AAA GAT TCT GGA TTC TTC ATG CTG AGG AAG GAC AGT	3414
Ser Pro Glu Glu Lys Asp Ser Gly Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser	
1035 1040 1045	
GAG AGG CGA GCT ACC CTT CAC AGG ATC CTG ACG GAA GAC CAA GAC AAA	3462
Glu Arg Arg Ala Thr Leu His Arg Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys	
1050 1055 1060 1065	
ATT GTG AGA AAC CTA ATG GAA TCT TTA GCT CAG GGG GCT GAA GAA CCG	3510
Ile Val Arg Asn Leu Met Glu Ser Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro	
1070 1075 1080	
AAA CTA AAA TGG GAA CAC ATC ACA ACC CTC ATT GCA AGC CTC AGA GAA	3558
Lys Leu Lys Trp Glu His Ile Thr Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu	
1085 1090 1095	
TTT GTG AGA TCC ACT GAC CGA AAA ATC ATA GCC ACC ACA CT GTCA AAG	3606
Phe Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys	
1100 1105 1110	
CTG AAA CTG GAG CTG GAC TTC GAC AGC CAT GGC ATT AGC CAA GTC CAG	3654
Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp Ser His Gly Ile Ser Gln Val Gln	
1115 1120 1125	
GTG GTA CTC TTT GGT TTT CAA GAT GCT GTC AAT AAA GTT CTT CGG AAT	3702
Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp Ala Val Asn Lys Val Leu Arg Asn	
1130 1135 1140 1145	
CAT AAC ATC AAG CCG CAC TGG ATG TTT GCC TTA GAC AGT ATC ATT CGG	3750
His Asn Ile Lys Pro His Trp Met Phe Ala Leu Asp Ser Ile Ile Arg	
1150 1155 1160	
AAG GCG GTA CAG ACA GCC ATT ACC ATC CTG GTT CCA GAA CTA AGG CCA	3798
Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr Ile Leu Val Pro Glu Leu Arg Pro	
1165 1170 1175	
CAT TTC AGC CTT GCA TCT GAG AGT GAT ACT GCT GAT CAA GAA GAC TTG	3846
His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser Asp Thr Ala Asp Gln Glu Asp Leu	
1180 1185 1190	
GAT GTA GAA GAT GAC CAT GAG GAA CAG CCT TCA AAT CAA ACT GTC CGA	3894
Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu Gln Pro Ser Asn Gln Thr Val Arg	
1195 1200 1205	
AGA CCT CAG GCT GTC ATT GAA GAT GCT GTG GCT ACC TCA GGC GTG AGC	3942
Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp Ala Val Ala Thr Ser Gly Val Ser	
1210 1215 1220 1225	
ACG CTC AGT TCT ACT GTG TCT CAT GAT TCC CAG AGT GCT CAC CGG TCA	3990
Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser	

1230	1235	1240	
CTG AAT GTA CAG CTT GGA AGG ATG AAA ATA GAA ACC AAT AGA TTA CTG			4038
Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg Met Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu			
1245	1250	1255	
GAA GAA TTG GTT CGG AAA GAG AAA GAA TTA CAA GCA CTC CTT CAT CGA			4086
Glu Glu Leu Val Arg Lys Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg			
1260	1265	1270	
GCT ATT GAA GAA AAA GAC CAA GAA ATT AAA CAC CTG AAG CTT AAG TCC			4134
Ala Ile Glu Glu Lys Asp Gln Glu Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser			
1275	1280	1285	
CAA CCC ATA GAA ATT CCT GAA TTG CCT GTA TTT CAT CTA AAT TCT TCT			4182
Gln Pro Ile Glu Ile Pro Glu Leu Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser			
1290	1295	1300	1305
GGC ACA AAT ATT GAA GAT TCT GAA CTT ACC GAC TGG CTG AGA GTG AAT			4230
Gly Thr Asn Ile Glu Asp Ser Glu Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn			
1310	1315	1320	
GGA GCT GAT GAA GAC ACT ATA AGC CGG TTT TTG GCT GAA GAT TAT ACA			4278
Gly Ala Asp Glu Asp Thr Ile Ser Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr			
1325	1330	1335	
CTA TTG GAT GTT CTC TAC TAT GTT ACA CGT GAT GAC TTA AAA TGC TTG			4326
Leu Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu			
1340	1345	1350	
AGA CTA AGG GGA GGG ATG CTG TGC ACA CTG TGG AAG GCT ATC ATT GAC			4374
Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile Asp			
1355	1360	1365	
TTT CGA AAC AAA CAG ACT TGACTGTTGC TCAATCTAAT CTTCGATGGA AATTCTAA			4430
Phe Arg Asn Lys Gln Thr			
1370	1375		
AAATTAATAC AGAGCTGATC TTCTTGGGGG TGGAAAATC GAAGGGAGAG GAGAAAGGCG			4490
CTGCACTTTA AATCCAGTAT TTGTTTACTC ATGTAAAAA AAA			4533

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒトASK1の推定アミノ酸配列を示した図である。2つの独立したクローン（クローン20およびクローン27）で想定される翻訳開始部位を矢印で示した。タンパク質キナーゼ領域は太字で示した。N末端の非触媒領域に見出されたFKBP型のペプチジループロリルシストランスイソメラーゼのモチーフは下線で示した。アミノ酸残基の略語は、A:Ala、C:Cys、D:Asp、E:Glu、F:Phe、G:Gly、H:His、I:Ile、K:Lys、L:Leu、M:Met、N:Asn、P:Pro、Q:Gln、R:Arg、S:Ser、T:Thr、V:Val、W:Trp、Y:Tyrである。

【図2】系統進化学的なMAPKKKの類縁関係を示した図である。

【図3】ASK1の組織分布を示したRNAプロット（電気泳動写真）である。Heart:心臓、Brain:脳、Placenta:胎盤、Lung:肺、Liver:肝臓、Skeletal Muscle:骨格筋、Kidney:腎臓、Pancreas:脾臓、S

pleen:脾臓、Thymus:胸腺、Prostate:前立腺、Testis:精巣、Ovary:卵巢、Small Intestine:小腸、Colon:結腸、Leukocyte:白血球。

【図4】ASK1遺伝子を発現させた間（ASK1、ASK1（K709R））または発現させなかった（vector）酵母変異株TM257-H1の生育（コロニー形成）を示した写真（生物の形態の写真）である。1.5Mソルビトール（sorbitol）存在下または非存在下において試験した。

【図5】インビオでのASK1によるMAPKKおよびMAPKの活性化を示した写真（電気泳動写真）である。活性化は、基質タンパク質のリン酸化を指標とした。各基質タンパク質の位置は、]印および矢尻印で示した。ASK1の共発現によるキナーゼ活性の増加の倍率を、各レーンの上に示した。倍率は、3回の独立した実験の平均値である。分子量はキログルトン（kDa）である。

【図6】インビトロでのASK1によるMAPKKの活性化を示した写真（電気泳動写真）である。COS7細

胞にp cDNA 3-ASK1をトランスフェクトし、細胞のライゼートを免疫前血清(m o c k p p t)または抗ASK1抗血清(ASK1 p p t)で免疫沈降した。免疫複合体またはバッファー溶液(buffer)をHis-MAPKK、His-SEK1、His-MKK3またはHis-MAPKK6の存在下(+)または非存在下(-)でインキュベートした後、それぞれのMAPKKのキナーゼ活性を、MAPKKにはGST-キナーゼネガティブMAPKを基質として、SEK1、MKK3およびMAPKK6にはHis-キナーゼ・ネガティブMPK2を基質として測定した。写真中「KN-MAPK」は、GST-キナーゼ・ネガティブMAPKを、「KN-MPK2」は、His-キナーゼ・ネガティブMPK2を、それぞれ表す。

【図7】安定的にトランスフェクト(transfection)したMv1Lu細胞でのASK1およびASK1(K709R)のZnC1₂依存的な発現を示した写真(電気泳動写真)である。

【図8】ASK1依存的な[³H]チミジンの取り込みの抑制を示した図である。黒四角形:ベクター単独、黒丸:ASK1、白丸:ASK1(K709R)。図は3回の独立した実験の代表例である。エラー・バーは標準偏差を表わす。

【図9】ZnC1₂誘導による用量依存的なASK1タンパク質の発現(上段)とASK1の活性化(下段)を示した写真(電気泳動写真)である。「no-IP」は、免疫沈降を行わずに細胞ライゼートを酵素標品として用いた場合を表わす。

【図10】ASK1依存的な内在性のSAPK(上段)およびp38(下段)の活性化を示した写真(電気泳動写真)である。p54およびp46 SAPK(上段)およびATF2(下段)の位置は、矢尻印および矢印でそれぞれ示した。

【図11】代表的な細胞の形態を位相差顕微鏡で同じ拡大率で撮影した写真(生物の形態の写真)である。ASK1依存的な細胞死が示されている。(上段)細胞を1%FBSを含むMEM培地中で、100μM ZnC1₂存在下または非存在下で26時間培養した。代表的な細胞の形態を位相差顕微鏡で同じ拡大率で撮影した写真(生物の形態の写真)である。(下段)細胞をFBSを含まないMEM培地中で、100μM ZnC1₂存在下または非存在下で25時間培養した。その後、TUNEL法により染色した。アポトーシスを起こした細胞は、ダーク・ブラウンに染色された部分で示されている。写真(生物の形態の写真)は、上段に比べて高い拡大率で撮影した。

【図12】ASK1依存的なDNA断片化を示した写真(電気泳動写真)である。

【図13】様々な細胞におけるTNFαによるASK1の活性化の時間経過を示した図である。(上段)ASK1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞におけるASK1活性の値を相対値で示した。結果は少なくとも5回の独立した実験からの平均値である。エラー・バーは標準偏差を示している。(下段)ASK1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞、ASK1をトランスフェクトしていない293細胞およびA673細胞におけるTNFαによるASK1活性の時間経過(min:分)を示した図である。

【図14】TNFαの用量依存的なASK1の活性化を示した図である。ASK1活性の値は平均値で示した。結果は少なくとも5回の独立した実験からの平均値である。エラー・バーは標準偏差を示している。

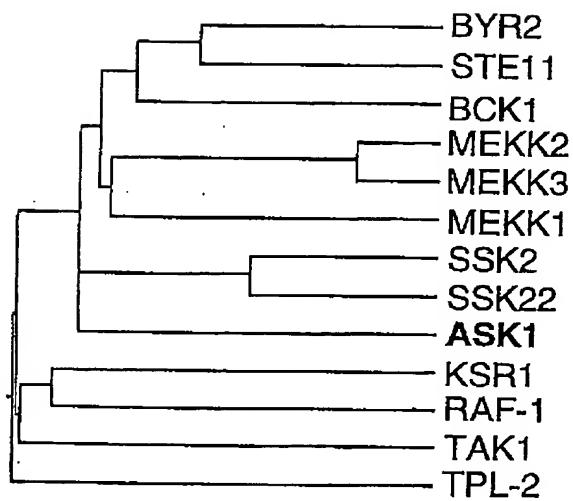
【図15】アクチノマイシンD存在下または非存在下(none)でTNF-αで刺激(Stimulation)した293細胞におけるDNA断片化が、ASK1(K709R)のトランスフェクション(Transfection)によって阻害されることを示した電気泳動写真である。

【図16】TNF-αで刺激(Stimulation)したJurrkat T細胞におけるDNA断片化が、ASK1(K709R)のトランスフェクション(Transfection)によって阻害されることを示した電気泳動写真である。図中、「none」は、トランスフェクションしなかった場合または刺激がなかった場合を示す。

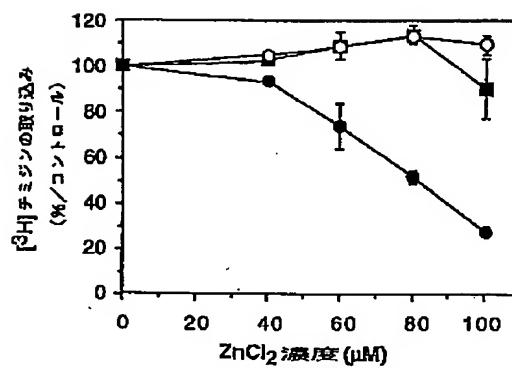
【図1】

MSTEADEGITFSVPPFAPSGFCTIPEGGICRRGGAAA VGEGEEHQLPPPPGSFWNVES 60
 → clone/20
 AAPGIGCPAATSSSATRGRGSSVCGGSRTTVAYVINEASQGQLVVAESEALQLREAC 120
 ETVGATL~~E~~ETLHFGKLDGETTVLDRFYNADIAVVEMSDAFRQPSLFYHLGVRESFSMANN 180
 IILYCDTNSDSLQSLKEIICQKNTMCTGNYTFVPMITPHNKVYCCDSSFMGLTELMQP 240
 NFELLGPICLPLVDRFIQLLKVAQASSSQYFRESILNDIRKARNLYTGKELAAELARIR 300
 QRVDNIEVLTADIVINLLSYRDIQDYDSIVKLVETLEKLPTFDLASHHVKFHYAFALN 360
 RRNLPGDRAKALDIMIPMVQSEGQVASDMYCLVGRIYKDMFLDSNFTDTESRDHGASWPK 420
 → clone 27
 KAFESEPTLQSGINYAVLLAAGHQFESSFELRKVGVKLSSLLGKGNLEKLQSYWEVGF 480
 FLGASVLANDHMRVIQASEKLFKLKTPAWYLKSIVETILYKHFVKLTTEQPVAKQELVD 540
 FWMDFLVEATKTDVTVVRFPVLILEPTKIQPSYLSINNEVEKTISIWHVLPDDKKGIH 600
 EWNFSASSVRGVSISKFEERCCFLYVLHNSDDFQIYFCTELHCKFFEMVNTITEEKGRS 660
 TEEGDCESDLLEYDYEDENGDRVVLGKGTGIVYAGRDLNSQVRIAIKEIPERDSRYSQ 720
 PLHEEIALHKHLKHNIVQYLGSFSENGFIKIFMEQVPGGSLYALLRSKWKPLKDNEQTI 780
 GFYTKQILEGLKYLHDNQIVHRDIKGDNVLINTYSGVLKISDFGTSKRLAGINPCTETFT 840
 GTLQYMAPEIIDKGPRGYGKAADIWSLGCTIEMATGKPPFYELGEPAAMFKVGMPKVN 900
 PEIPESMSAEAKAFILKCFFEPDPDKRACANDLLVDEFLKVSSKKKTQPKLSALSAGSNA 960
 EXLRSISLPVPLVEDTSSSEYGSVSPDTELKVDPFSFKTRAKSCGERDVKGIRTLFLG 1020
 IPDENFEDHSAPPSPEEKDSGFFMLRKDSERRATLHRILTEDQDKIVRNLMESLAQGAEE 1080
 PKLKWEHITTLIASLREFVRSTDRIKIATTLSKLKLELDFDSHGISQVQVLFQDAVN 1140
 KVLRNHNKPHWMFALDSIIRKAVQTAITILVPELRPHFSLASESDTADQEDLDVEDDHE 1200
 EQPSNQTVRRPQAVIEDAVATSGVSTLSSTVSHDSQSAHRSLSNVQLGRMKIETNRLLEEL 1260
 VRKEKELQALLHRAIEEKDQEIKHLKLKSQPIEIPELPVFHLNSSGTNIEDSELTDWLRV 1320
 NGADEDTISRFLAEDYTLVDVLYYVTRDDLKCLRLRGGMCLTLWKAIIIDFRNKQT 1375

【図2】

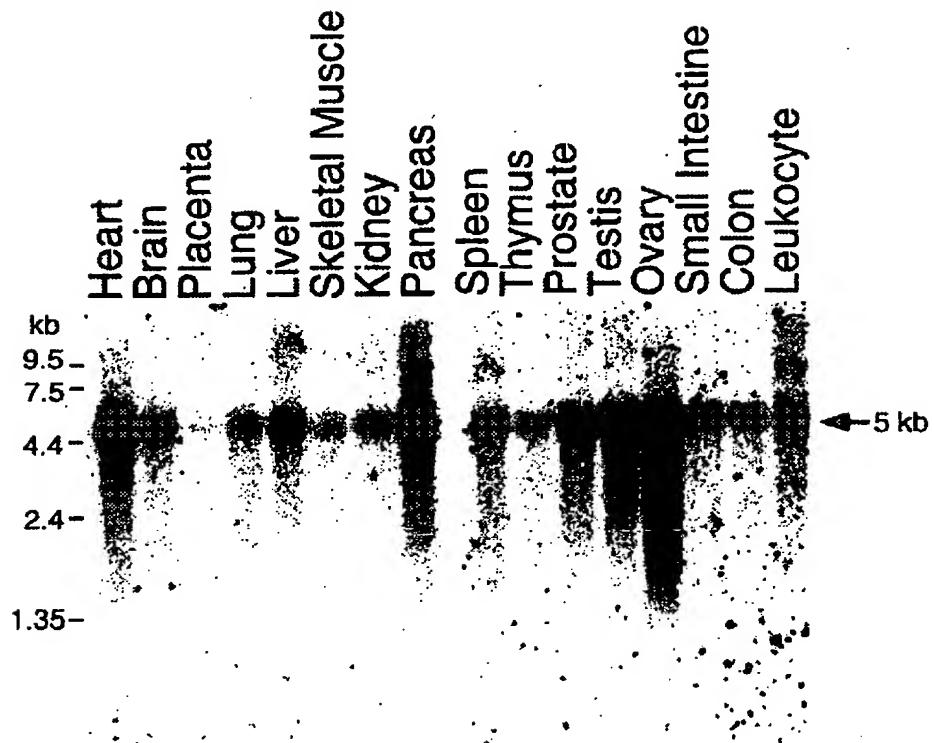


【図8】



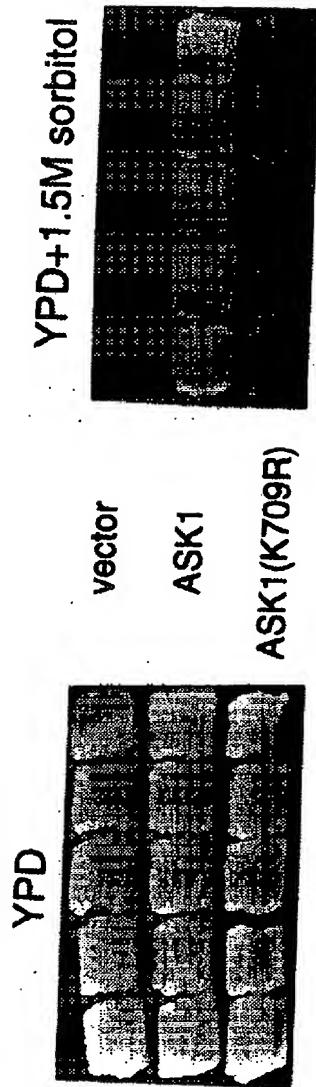
【図3】

図面代用写真



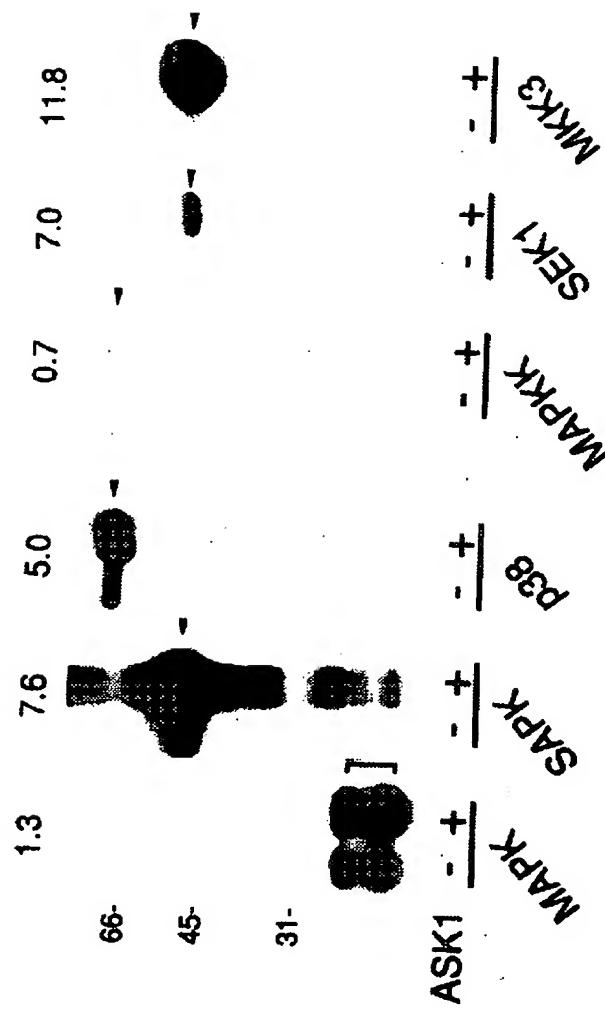
【図4】

図面代用写真



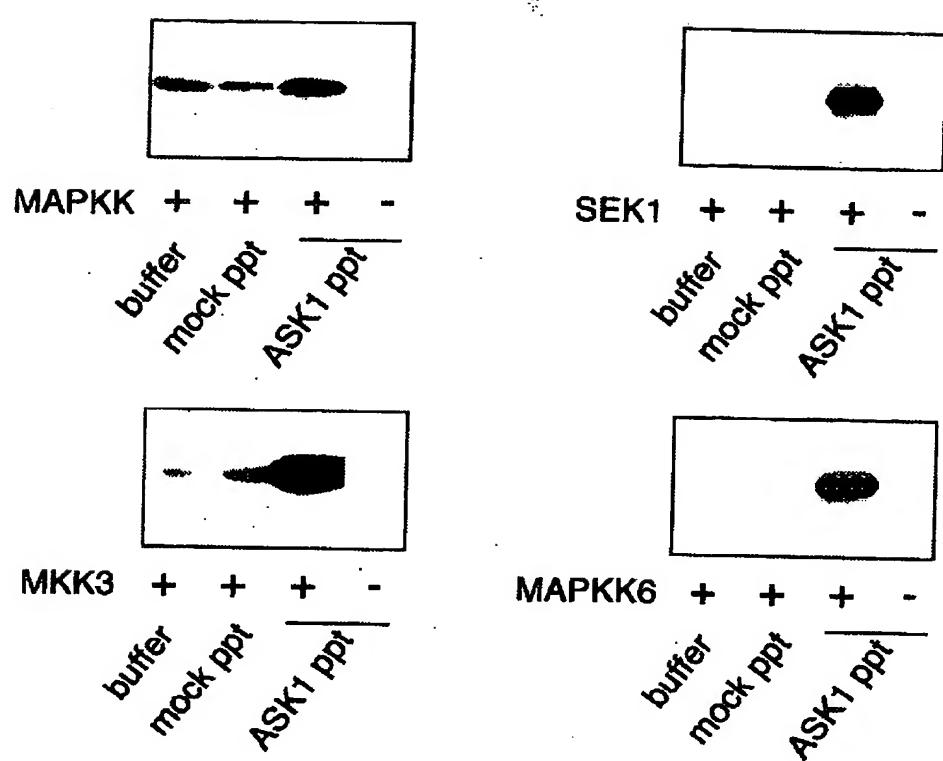
【図5】

圖面代用寫真

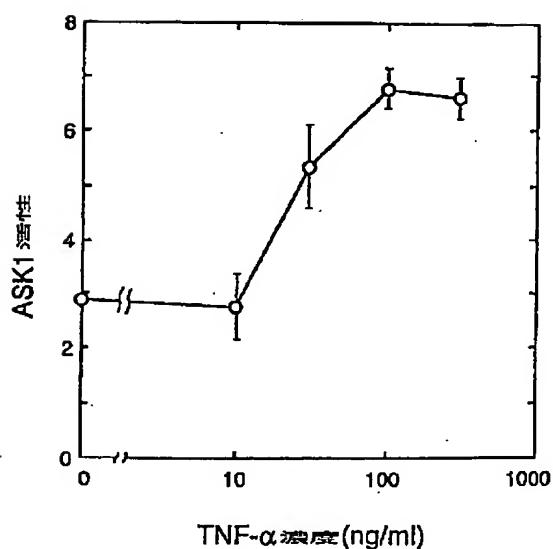


【図6】

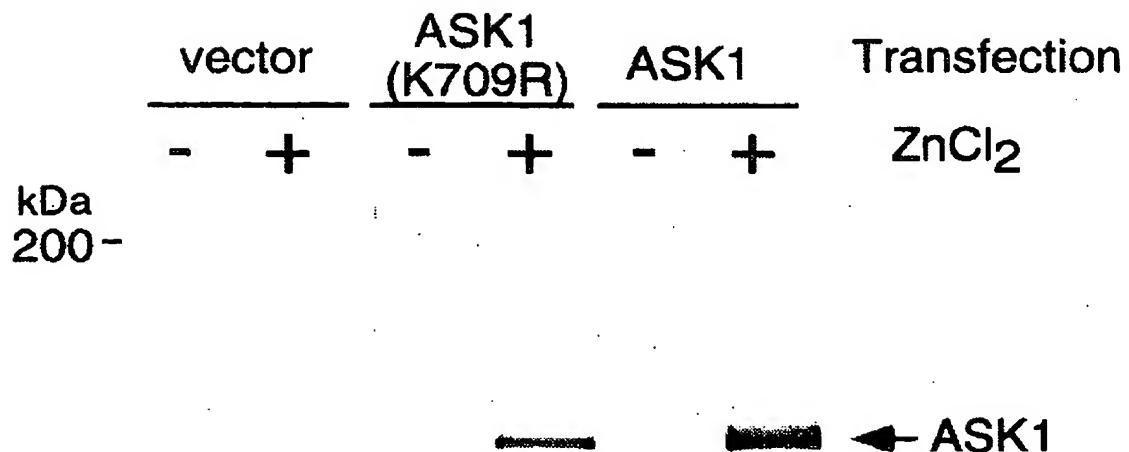
図面代用写真



【図14】



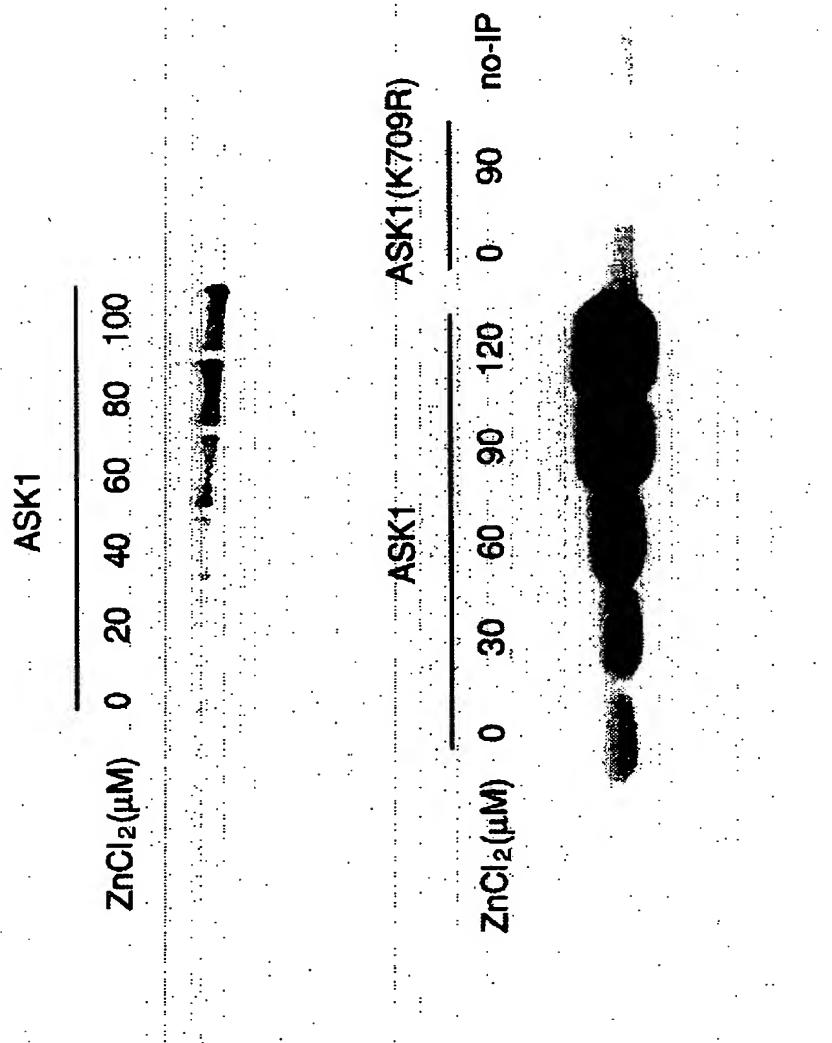
【図7】



図面代用写真

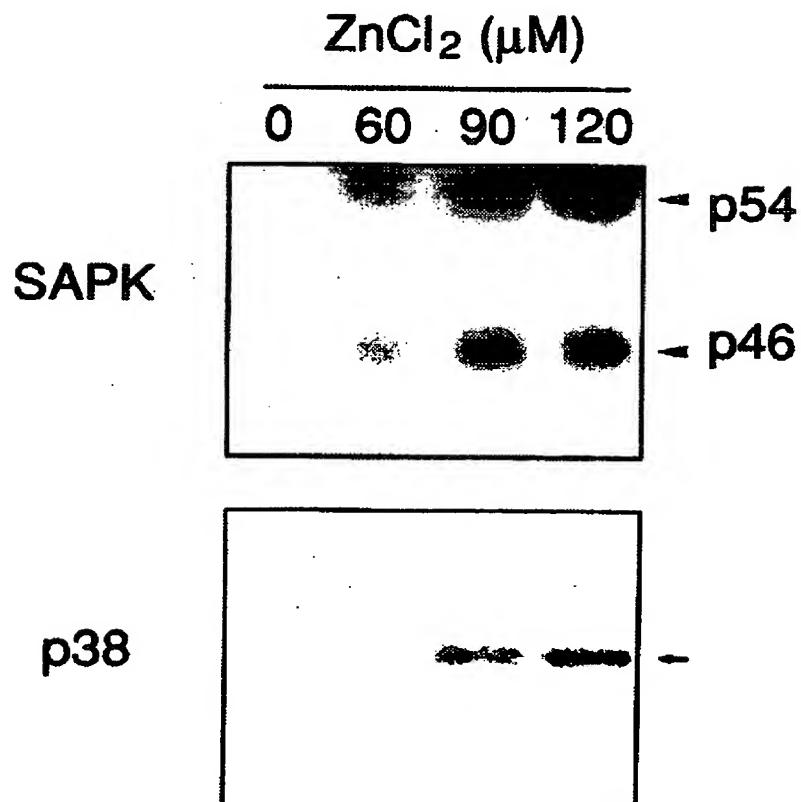
【図9】

図面代用写真



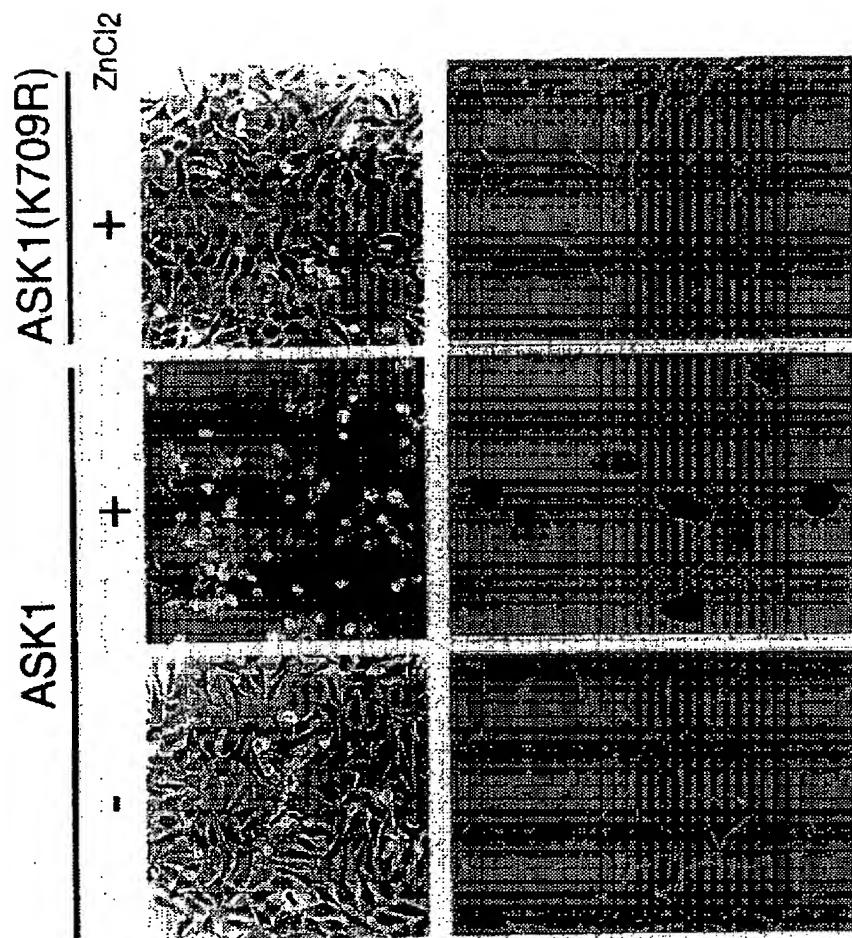
【図10】

図面代用写真



【図11】

図面代用写真

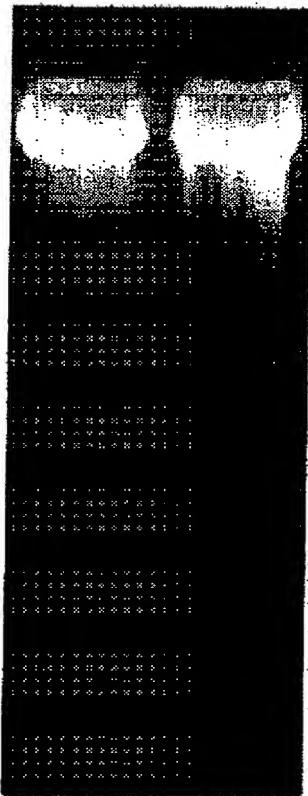


【図12】

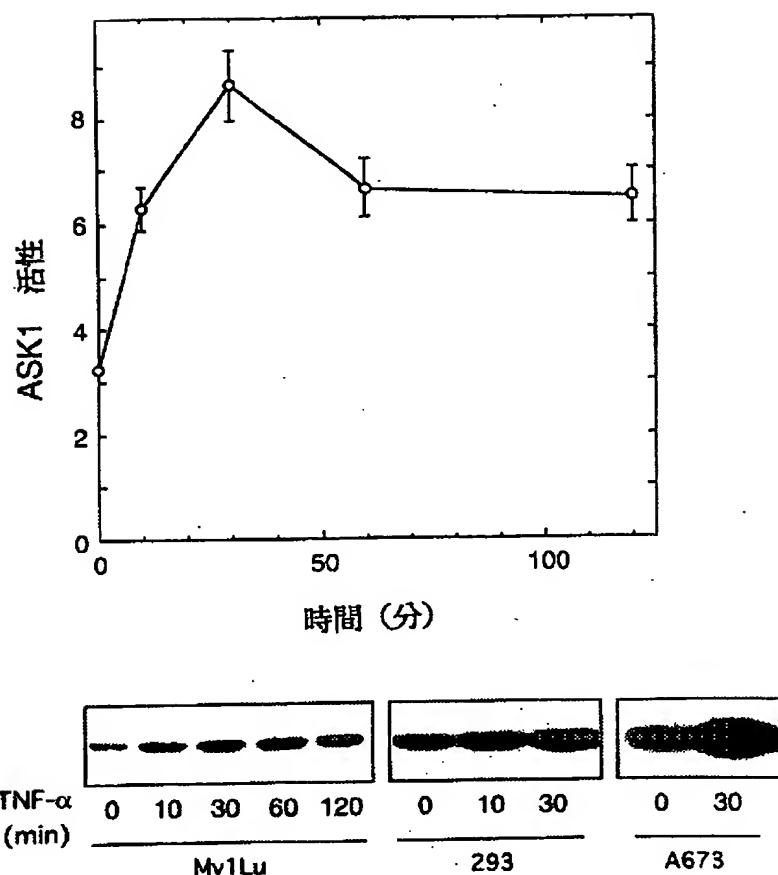
図面代用写真

ASK1

- + ZnCl_2



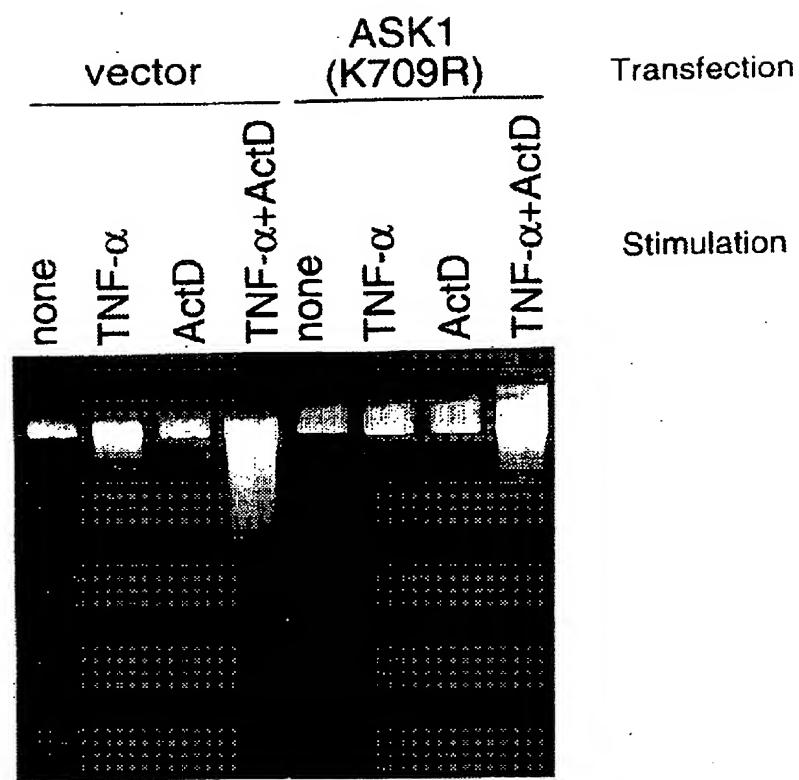
【図13】



図面代用写真

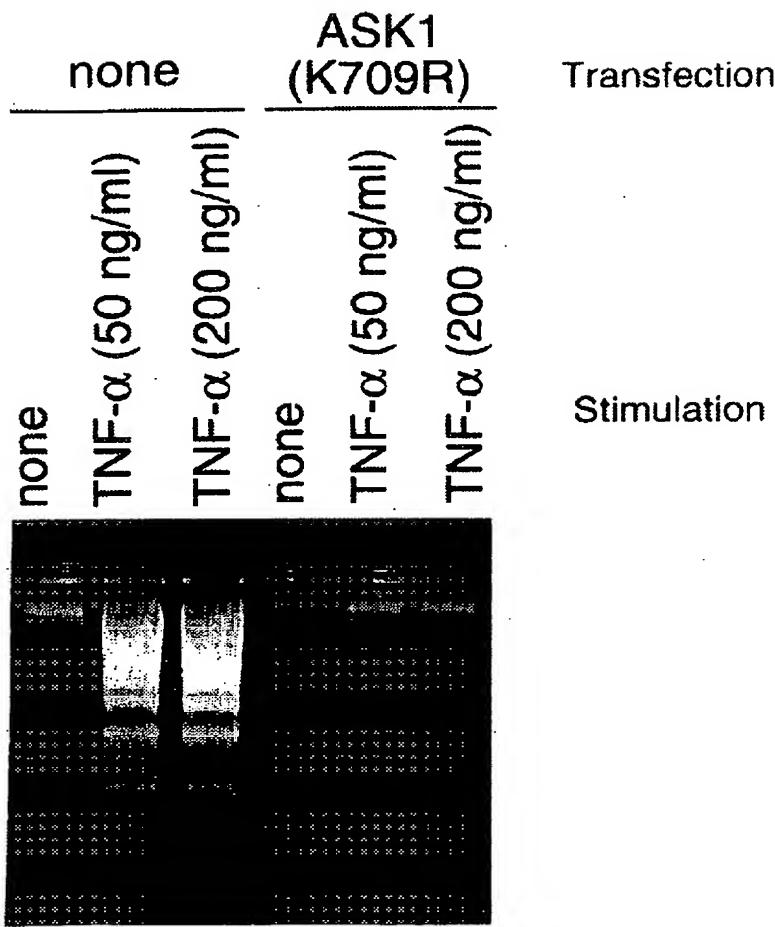
【図15】

圖面代用寫真



【図16】

図面代用写真



【手続補正書】

【提出日】平成9年2月26日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図13

【補正方法】変更

【補正内容】

【図13】様々な細胞におけるTNF α によるASK1の活性化の時間経過を示した図および電気泳動写真であ

る。（上段）ASK1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞におけるASK1活性の値を相対値で示した。結果は少なくとも5回の独立した実験からの平均値である。エラー・バーは標準偏差を示している。（下段）ASK1をトランスフェクトしたMv1Lu細胞、ASK1をトランスフェクトしていない293細胞およびA673細胞におけるTNF α によるASK1活性の時間経過（min：分）を示した電気泳動写真である。

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K	16/40		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N	1/19		9/12	
	5/10		C 1 2 P 21/02	C
	9/12		21/08	
C 1 2 P	21/02		A 6 1 K 39/395	E
	21/08			T
// A 6 1 K	39/395		37/02	A D U
			C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N	5/10			
C 1 2 R	1:91)			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.